Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. med. U. Göbel
des
Zentrums für Kinderheilkunde
der Universität Düsseldorf

Die Verformbarkeit von Erythrozyten nach Inkubation mit Bilirubin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

PETER TROTZKE

1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0090

Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. med. U. Göbel
des
Zentrums für Kinderheilkunde
der Universität Düsseldorf

Die Verformbarkeit von Erythrozyten nach Inkubation mit Bilirubin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
PETER TROTZKE

1985

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.
Dekan: Prof. Dr. Hopf
Referent: Prof. Dr. U. Göbel
Koreferent: Prof. Dr. J. Fischer

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

1. Bilirubin
1.1. Entstehung, Metabolismus
1.2. Toxizität des Bilirubins
1.3. Toxische Wirkung des Bilirubin auf den Erythrozyten
1.3.1. Bilirubinaufnahme durch den Erythrozyten
1.3.2. Bilirubin-Albumin- und Bilirubin-Erythrozyten-Bindung
1.3.3. Hämolyse durch Bilirubin
1.3.4. Stoffwechselveränderungen
1.3.5. Membranveränderungen

2. Zum Thema der Arbeit
2.1. Bedeutung der Verformbarkeit des Erythrozyten
2.2. Veränderungen der Verformbarkeit
2.3. Problemstellung
2.3.1. Bestimmung der Verformbarkeit
2.3.2. Beeinflussung der Verformbarkeit durch Bilirubin

II. Methodische Entwicklung

1. Filtrationstechnik
1.1. Prinzip der Methode
1.2. Filter
1.3. Beschreibung des Apparates
1.4. Eichung des Apparates mit einer Dextranlösung

2. Präparation der Blutproben

3. Einflußgrößen, Standardisierung
3.1. Hämatokrit
3.2. pH und Sauerstoffsättigung
3.3. Fibrinogen
3.4. MCV, MCHC und Osmolarität
3.5. Bestimmung des Meßfehlers
3.6. Normalbereich

4. Diskussion zur Filtrationstechnik

III. Bestimmung der Verformbarkeit von Erythrozyten nach Inkubation mit Bilirubin

1. Methodisches Vorgehen
1.1. Zusatz von Bilirubin zu den Erythrozytensuspensionen
1.2. Inkubation der Suspension bei 37 C, Inkubationsdauer
1.3. Waschen der Erythrozyten nach Inkubation
1.4. Bestimmung des Bilirubins im Plasma
1.5. Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma nach Inkubation mit Bilirubin und NaOH

2. Filtration von bilirubininkubierten Erythrozytensuspensionen im Vergleich zu einem Leerwert

3. Filtration von gewaschenen Erythrozytensuspensionen

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

1. Bilirubin

1.1. Entstehung, Metabolismus

Bilirubin entsteht zu 80 - 90 % als Abbauprodukt des Häms im retikuloendothelialen System (RES). 10 - 20 % stammen aus dem Abbau von hämenthaltenden Proteinen und reifenden roten Blutkörperchen im Knochenmark. Das wasserunlösliche, freie, indirekte Bilirubin wird über das Blut in Bindung an Albumin zur Leber transportiert, wo es unter Mitwirkung des Enzyms Glucuronyltransferase mit zwei Molekülen Glucuronsäure gekoppelt wird. Dieses wasserlösliche, gekoppelte, direkte Bilirubin wird über die Galle ausgeschieden (119).

Physiologischerweise kommt das Bilirubin nur in Konzentrationen von 0,4 - 1,0 mg/100 ml im Blut vor (122). Unter bestimmten krankhaften Bedingungen (vermehrter Erythrozytenuntergang, hepatogene Erkrankung, Verschluß der ableitenden Gallenwege, Störung der Bilirubinkonjugation in der Leber) kann die Bilirubikonzentration im Blut ansteigen, es entsteht ein Ikterus (19).

1.2. Toxizität des Bilirubins

Da eine Hyperbilirubinämie klinisch zu beobachtende toxische Wirkungen zeigt, suchten einige Untersucher biochemisch definierte Stoffwechselveränderungen durch das Bilirubin.

Day (31) beschreibt eine Herabsetzung der Sauerstoffaufnahme in frischen Geweben durch Bilirubin. Zetterstrom (148) fand, daß Bilirubin die oxydative Phosphorylierung in Lebermitochondrien hemmt.

In hohen Konzentrationen bewirkt Bilirubin eine Schwellung der Mitochondrien (16).

Labbe (70) fand eine hemmende Wirkung des Bilirubins auf die Hämsynthese im Knochenmark. Aus einer anderen Untersuchung geht hervor, daß Bilirubin die Immunabwehr in vivo beim Menschen hemmt (105).

1.3. Toxische Wirkung des Bilirubin auf den Erythrozyten

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit ist die Wirkung des Bilirubins auf den Erythrozyten.

1.3.1. Bilirubinaufnahme durch den Erythrozyten

Es ist lange bekannt, daß Bilirubin durch die Erythrozyten aufgenommen wird (Literaturübersicht in 109). Watson (139) konnte durch Auswaschen von Erythrozyten ikterischer Neugeborener nachweisen, daß die roten Blutkörperchen Bilirubin aufnehmen.

Oski (89) fand, daß inkompatible Erythrozyten weniger Bilirubin aufnahmen als kompatible. Er folgerte daraus, daß die Bilirubinbindung ein Membranprozeß sei, der durch die Antikörper an der Membran verhindert wird. Er deutete auch seine Befunde in der Weise, daß das an der Membran gebundene Bilirubin ein Grund für die verminderte Überlebenszeit der Neugeborenenerythrozyten sein könne. Bratlid (14) konnte dagegen keine verminderte Bilirubinaufnahme bei Inkompatibilität finden.

Foetale Erythrozyten nehmen mehr Bilirubin auf als Erwachsenenerythrozyten. Der Mechanismus ist unklar (50).

Die Bindungskapazität der Erythrozyten für Bilirubin ist beschrieben worden mit 3 mg Bilirubin / 100 ml gepackte Erythrozyten. Von der Gesamtmenge werden ca.

30 % in der Membran gefunden. Die Membran selbst stellt jedoch nur ca. 1 % des Erythrozytenvolumens dar, d.h., die Membran bindet ca. 40 mal mehr Bilirubin als die gelösten Teile im Plasma (52).

1.3.2. Bilirubin-Albumin- und Bilirubin-Erythrozyten-Bindung

Zahlreiche Untersuchungen hatten das Ziel, die Wechselwirkung zwischen Albumin- und Erythrozytenbindung des Bilirubins aufzuklären.

1 Mol Albumin bindet bei einem pH von 7,4 2 Mol Bilirubin, wobei das zweite Molekül leichter dissoziieren kann (ausgedrückt in der Dissoziationskonstanten) (15, 61,88). Eine wichtige Rolle spielen bei der Bindung an das Albumin die zwei Dipyrollringe des Bilirubins, die zwei mögliche Bindungsstellen besetzen. Xanthobilirubinat, das nur einen Dipyrollring aufweist, besetzt nur eine Bindungsstelle. Es können 4 Mol Xanthobilirubinat durch 1 Mol Albumin gebunden werden (61).

Die Albumin-Bilirubin-Bindung ist pH-abhängig. Bei sinkendem Serum-pH ist weniger Bilirubin an Albumin gebunden, der Gallenfarbstoff steht dann frei zur Aufnahme in andere Gewebe, z.B. den Erythrozyten (15, 109).

Bei konstantem Albuminspiegel binden Albumin und Erythrozyten konstante Bilirubinanteile trotz schwankender Bilirubinkonzentrationen. Wird die Albuminkonzentration kleiner, steigt die Bilirubinbindung durch den Erythrozyten (7).

Kaufmann (65) stellt dazu fest, daß die Erythrozytenbindung des Bilirubins abhängig ist vom molaren Quotienten Bilirubin zu Albumin. Die Farbstoffaufnahme des Erythrozyten steigt, wenn bei gleichbleibendem molaren Quotienten die Bilirubinkonzentration

zunimmt oder bei gleichbleibender Bilirubinkonzentration das molare Verhältnis abnimmt, d.h., die Albuminkonzentration kleiner wird.

Bratlid (14) spricht von der Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen freiem, erythrozytengebundenem und albumingebundenem Bilirubin.

In diesem Rahmen ist auch die Feststellung Behrman's (8) zu sehen, daß bei einer Erhöhung des Serumalbumins vermehrt Bilirubin das Gewebe verläßt, in dem es toxische Erscheinungen hervorrufen kann.

1.3.3. Hämolyse durch Bilirubin

Bilirubin führt unter Licht und in Anwesenheit von Sauerstoff zur Hämolyse von Erythrozyten (13, 69, 93, 96). Aber auch unter Lichtabschluss ist eine Hämolyse zu beobachten (87, 93). Dieser Effekt tritt bei einer Bilirubinkonzentration von 8 - 9 mg/100 ml nach 4 Stunden ein (93).

Die Hämolyse ist vom Grad des ATP-Verlustes der Erythrozyten abhängig. So zeigen gelagerte rote Blutkörperchen, die einen herabgesetzten ATP-Spiegel haben, eine erhöhte Hämolyserate. Durch Inosininkubation, die eine Erhöhung des ATP-Spiegels bewirkt, kann die Hämolyserate gesenkt werden (96).

1.3.4. Stoffwechselveränderungen

Bilirubin bewirkt sowohl in vitro als auch in vivo Veränderungen des Erythrozytenstoffwechsels.

Odell (87) konnte finden, daß der beschriebenen Hämolyse eine Abnahme der Aktivität der Membran-ATP-ase vorausgeht. Sie wird durch Bilirubin gehemmt.

Cheung (25) fand bei Bilirubinkonzentrationen um 20 mg/100 ml eine Abnahme des Glucoseverbrauchs und einen Abfall des ATP-Gehaltes der Erythrozyten. Diese Stoffwechselsituation war verbunden mit morphologischen Veränderungen der Erythrozyten, die über Stachelzellformen und Sphärozyten zur Hämolyse führten.

Petrich (93) konnte diese Ergebnisse bei Bilirubinkonzentrationen von 8 - 9 mg/100 ml bestätigen. Er fand, daß sich neben dem ATP-Abfall in vitro auch ein 2,3-Diphosphoglyceratabfall einstellte. In vivo ist der bilirubinabhängige ATP-Abfall nicht nachweisbar, da ATP aus 2,3-Diphosphoglycerat resynthetisiert werden kann. Es kommt in vivo nur zum Abfall des 2,3-Diphosphoglycerat (95).

Die Hemmung des Glucoseverbrauchs der Erythrozyten durch Bilirubin ist beschrieben worden (25, 93). Krieg (69) fand, daß die minimale Bilirubinkonzentation, bei der nach zweistündiger Inkubation eine Hemmung festzustellen ist, bei 3 mg% liegt.

1.3.5. Membranveränderungen

Die Hemmung der Membran-ATP-ase durch Bilirubin wurde schon erwähnt (87). Neuere Studien haben gezeigt, daß die Erythrozytenmembran Bindungsstellen für Bilirubin besitzt. Durch Untersuchungen des Einflusses von pH, Temperatur, Erhitzung und Behandlung mit Trypsin konnte festgestellt werden, daß Bilirubin sich an Phospholipiden und nicht an Eiweißkörper der Membran bindet (14, 109). Die Integrität der Erythrozytenmembran, die aus einem Eiweißskelett und einer Lipiddoppelschicht besteht, ist durch die Bindung gestört (66).

Girotti (51) konnte feststellen, daß es an Erythrozytenmembranen unter Licht und in Bilirubinlösungen zu charakteristischen Proteinveränderungen kommt. Große

UNIV. LEIDEN BIBL.

Membranproteine verschwinden aus dem Elektrophorogramm, andere Polypeptide erscheinen dafür. Bilirubin führt in Anwesenheit von Licht und Sauerstoff zu einem Verlust von Natrium und Glucose-6-Phosphat. Während der Natriumverlust durch Proteinveränderungen bedingt ist, entsteht der Glucose-6 Phosphatverlust durch Peroxidation von Membranlipiden (33).

Da bestimmte Proteinfraktionen der Membran eine Rolle in der Glucoseaufnahme des Erythrozyten zugebilligt wird (130), könnte hier eine Erklärung des verminderten Glucoseverbrauchs unter Bilirubin möglich sein. Die Membran erscheint als der primäre Angriffspunkt des Bilirubin.

2. Zum Thema der Arbeit

2.1. Bedeutung der Verformbarkeit der Erythrozyten

Wie aus den unter Punkt 1.3. aufgeführten bisher bekannten Tatsachen zu entnehmen ist, hat Bilirubin einen großen Einfluß auf den Stoffwechsel, auf die Membran und auf die morphologische und funktionelle Intaktheit der Erythrozyten.

Eine essentielle Eigenschaft des Erythrozyten ist seine Verformbarkeit. Erythrozyten mit einem mittleren Durchmesser von 8 µm können ohne Aufwendung eines großen Druckes Poren von 3 µm passieren (22, 79). Diese Fähigkeit erlaubt es dem roten Blutkörperchen, im Körper des Menschen das Kapillarbett zu überwinden. Die durchschnittliche Kapillarweite des Menschen beträgt 5 µm (22).

Große Bedeutung gewinnt die Verformbarkeit des Erythrozyten bei der Betrachtung der Blutpassage durch die Milz (144). Es ist schon lange bekannt, daß alte oder geschädigte Erythrozyten durch die Milz ausgefiltert und abgebaut werden (12, 16, 21, 23, 24, 84).

Da Untersuchungen ergeben haben, daß alte Erythrozyten eine verminderte Verformbarkeit haben, zieht LaCelle (71) den Schluß, daß allein die Flexibilitätsabnahme die Überlebenszeit der Erythrozyten bestimmt. Starr gewordene Erythrozyten können die Milzkapillaren nicht mehr passieren und werden ausgefiltert.

2.2. Veränderungen der Verformbarkeit

Verschiedene Faktoren führen zur Steifheit des roten Blutkörperchen. Sie kann bedingt sein durch veränderte Eigenarten des Erythrozyten selbst oder durch ein verändertes Milieu ("Umweltfaktoren"), in dem sich das Blutkörperchen befindet (110).

Die Verformbarkeit wird durch drei Faktoren bestimmt: 1. die Zellgeometrie, 2. die zytoplasmatische Viskosität und 3. die Membraneigenschaften (4, 11, 28, 46, 79, 83, 84).

Veränderungen des Volumen-Oberflächenverhältnisses durch Schwellung des Erythrozyten in hypoosmolaren Lösungen führen zu einem Flexibilitätsverlust. Auch eine Schrumpfung der Zelle in hyperosmolaren Lösungen hat einen Verformbarkeitsverlust zur Folge (11). Kugelzellen und Sichelzellen haben eine verminderte Verformbarkeit (76).

Steigt die Viskosität des Zellinhaltes durch einen Anstieg der mittleren corpusculären Hämoglobinkonzentration (MCHC) oder durch einen veränderten Lösungszustand des Hämoglobins, so nimmt die Flexibilität des Erythrozyten ab (z.B. Alterung des Erythrozyten, Sichelzellanämie, verschiedene Hämoglobinopathien) (11, 40, 83, 84).

Die Erythrozytenmembran, die aus einer Lipiddoppelschicht und einem Eiweißskelett besteht(78, 120), kann durch verschiedene Veränderungen steifer werden.

Bindung von Heinzkörpern an die Membran führen zu ihrer Versteifung (133, 134). Bei megaloblastischen Anämien führt die Membransteifheit zu einem Deformabilitätsverlust (4). Hitzebehandlung der Membran vermindert ihre Verformbarkeit (20, 84, 99, 116, 146).

Milieubedingte Flexibilitätsabnahmen findet man bei der Senkung des pH (115) und des Sauerstoffpartialdruckes (54).

Schwere Traumen führen zur Herabsetzung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten (9). Nach offenen Herzoperationen ist die Verformbarkeit der roten Blutkörperchen vermindert (67). Die Flexibilität nimmt zeitabhängig bei cardiopulmonalem Bypass ab (147). Allgemein bei gewebsverletzenden Operationen ist eine reduzierte Verformbarkeit beschrieben worden (80). Wie beim Raynaud Syndrom, bei dem ebenfalls steifere Zellen in Eigenplasma, jedoch nicht in Fremdplasma gefunden wurden, wird bei den Operationen ein nicht identifizierter Plasmafaktor für den Flexibilitätsverlust verantwortlich gemacht (34, 37).

Hinweise auf eine Beeinflussung der Verformbarkeit durch veränderte Stoffwechselbedingungen geben einige Untersuchungen. So konnte festgestellt werden, daß bei dekompensierter Lebercirrhose die Flexibilität der Erythrozyten vermindert ist (112). Auch bei bestimmten Stoffwechsellagen eines Diabetikers konnte eine verminderte Verformbarkeit gefunden werden (43, 118, 147). Eine Beeinflussung der Membran im Sinne einer Versteifung durch Verbindungen mit dem Hb-A-1C wird diskutiert (6, 81, 92). Unterschiedlich fällt die Beurteilung der Flexibilität bei gut eingestelltem Diabetes aus (6, 81, 112).

In der Progesteronphase des weiblichen Zyklus fand Mercke (82) eine verminderte Filtrierbarkeit von Erythrozyten. Bei Einnahme von Kontrazeptiva sei die Flexibilität reduziert (90). Spätere Untersuchungen (17)

zeigten keine Veränderungen. Widersprüchlich sind ebenfalls die Literaturangaben zur Verformbarkeit der Erythrozyten schwangerer Frauen. Es finden sich Angaben über eine Verbesserung als auch über eine Verschlechterung der Flexibilität in der Schwangerschaft (17, 18, 57, 79, 128).

Patienten mit verschiedenen Formen einer arteriellen Verschlußkrankheit zeigen eine verminderte Verformbarkeit ihrer Erythrozyten (32, 36, 38, 43, 64, 79, 104). Chronische Raucher weisen Erythrozyten mit verminderter Flexibilität auf (86). Da nach rekonstruierenden Gefäßoperationen oder nach Amputationen bei Gangrän die Verformbarkeit besser wird, wurde auch hier, ähnlich wie bei dem Raynaudsyndrom, ein Plasmafaktor für den Verlust verantwortlich gemacht.

Viele Studien hatten das Ziel, die positive Beeinfussung der Durchblutung durch medikamentöse Verbesserung der herabgesetzten Flexibilität nachzuweisen (Übersichten in 39, 47, 48). Die diskutierten und teilweise nachgewiesenen Wirkungsmechanismen reichen von der Anhebung des Adenosintriphosphatgehaltes (ATP) des Erythrozyten, über eine Verminderung des Calcium-Einstroms, über eine protektive Wirkung gegenüber negativen Einflüssen wie Hyperosmolarität und Lactacidose bis hin zur regulierenden Wirkung von Prostaglandinen (1, 3, 32, 35, 36, 42, 44, 49, 68, 91, 100, 111, 126, 138).

Andere Untersucher testeten die Wirkung bestimmter Substanzen auf die Verformbarkeit der roten Blutkörperchen. Es wurden Erythrozyten mit verschiedenen Stoffen inkubiert und danach die Filtrabilität bestimmt. Zellen , die mit Acetaldehyd behandelt wurden, konnten Poren von 5 µm Durchmesser nicht passieren (26).

Pheniramin, das die Zellmembran angreift, führt zu einer Abnahme der Filtrationsrate (41). Amidinierte Erythrozyten (Inkubation in Dimethyladipinsäurediimidoester) zeigen eine verminderte Verformbarkeit, bedingt durch eine Vernetzung im Innern der Zelle (55). Toxische Substanzen (Silbernitrat, Jod, Kampher und andere) bewirken, daß die Erythrozyten Poren von 5 µm nicht mehr passieren können (117). Acetylphenylhydrazin führt über eine vermehrte Heinzkörperbildung zur Abnahme der Flexibilität (135).

2.3. Problemstellung

1. Bestimmung der Verformbarkeit

Um eine Aussage über die Verformbarkeit der Erythrozyten machen zu können, muß eine geeignete Methode zu deren Bestimmung entwickelt werden.

Neben verschiedenen anderen Verfahren (zusammengestellt in 5, 28, 79, 45, 83, 84, 114) hat sich die Bestimmung der Filtrabilität als Maß der Verformbarkeit von roten Blutkörperchen bewährt (2, 18, 27, 53, 54, 56, 57, 58, 62, 74, 76, 85, 108, 115, 127, 129, 131, 132). Grundlage der einzelnen Methoden ist die Überlegung, daß sich die Erythrozyten bei der Passage durch einen Filter, der eine im Vergleich zum Blutkörperchendurchmesser kleinere Porenweite besitzt, verformen müssen. Die Erythrozyten als verformbare Teilchen einer Suspension bestimmen die Zeit, die die Lösung zur Passage des Filters benötigt. Die Zeit oder die Flußrate kann als Maß der Verformbarkeit betrachtet werden.

Im ersten Teil dieser Studie wird die Entwicklung einer Filtrationsmethode zur Bestimmung der Deformabilität beschrieben und deren Aussagekraft bewertet.

2.3.2. Beeinflussung der Verformbarkeit durch Bilirubin

Wie die unter 2.2. genannten Beispiele zeigen, greifen toxische Substanzen die physiologische Intaktheit der Erythrozyten an, was sich in dem Verlust oder der Einschränkung der Verformbarkeit ausdrückt. Aufgabe dieser Studie ist es nun, eine unter pathologischen Bedingungen erhöht vorkommende, körpereigene Substanz, das Bilirubin, in ihrer Wirkung auf die Erythrozytenverformbarkeit zu testen.

Zu diesem Zweck werden Erythrozyten in mit Bilirubin versetztem Plasma inkubiert, und die Verformbarkeit in bestimmten Zeitabständen gemessen. Parallel wird ein Leerwert ohne Bilirubin mitgeführt und gemessen. Zur Feststellung eines eventuell reversiblen Effektes des Bilirubin auf die Verformbarkeit werden die Erythrozyten am Ende der Inkubationszeit mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die Deformabilität bestimmt. Das Gleiche wird mit einem Leerwert durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im zweiten Teil der vorliegenden Studie wiedergegeben. Die pathophysiologische Bedeutung der gefundenen Ergebnisse ist zu diskutieren.

II. Methodische Entwicklung

1. Filtrationstechnik

Die verwendete Methode wurde nach Schmid-Schönbein (115) entwickelt.

1.1. Prinzip der Methode

Erythrozytensuspensionen und zellfreies Plasma werden durch Polycarbonat-Siebe (Nuclepore^{R}) mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 5 µm bei einem bestimmten Druck gefiltert. Die Flußzeit eines festgelegten Volumens (1 ml) wird mit der Stoppuhr gemessen und die Flußrate V berechnet. Die erhaltenen Werte $V_{Susp.}$ - Flußrate einer Erythrozytensuspension mit dem Hämatokrit 10 - und V_{Plasma} - Flußrate von zellfreiem Plasma - werden in einem Quotienten $V_{rel} = V_{Susp.}/V_{Plasma}$ zusammengefaßt. Diese relative Flußrate wird als Maß für die Verformbarkeit der Erythrozyten angenommen.

1.2. Filter

In den Versuchen wurden Polycarbonat-Siebe (Nuclepore^{R} der Fa. General Electric Company, Pleasontown, USA) mit einem angegebenen Porendurchmesser von 5 µm verwendet. Die Siebe haben einen Durchmesser von 13 mm und eine Dicke von 11 - 12 µm (115).

Um die Strukturen der Siebe zu erfassen, wurden sie mit dem Lichtmikroskop betrachtet. Dabei wurden mit Hilfe eines Meßokulars bei jedem Filter 30 zufällig herausgesuchte Poren in ihrem Durchmesser gemessen und der Durchschnittswert berechnet. Ebenfalls wurden in 10 beliebig eingestellten Gesichtsfeldern mit einer bestimmten Fläche die Poren gezählt. Aus der Zahl der Poren und der gegebenen Fläche wurde die Verteilung der Poren pro cm^2 errechnet. Außerdem wurden Doppel-, Dreifach- und

Vierfachformen der Poren zahlenmäßig festgehalten.

Die Ergebnisse dieser mikroskopischen Messungen sind in Tab. 1 und Abb. 1 und 2 wiedergegeben.

Alle Siebe, deren durchschnittliche Porenweite kleiner als 4,2 µm oder größer als 5,0 µm war, wurden nicht für die Messungen verwendet.

Vor den Filtrationsversuchen wurden die Filter in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt.

Fast alle Siebe wurden für mehrere Messungen gebraucht. Zwischen jeder Filtration wurden die Siebe nach dem von Schmid-Schönbein (115) angegebenen Verfahren gereinigt.

Tab. 1 Daten über Nuclepore^{R}-Siebe

Anzahl der Siebe n	Mittlerer Porendurchmesser in µm ± SD	10^5 Poren/cm^2 ± SD
163	4,50 ± 0,28	4,0 ± 0,43

Doppelformen	Dreifachformen	Vierfachformen
in % der Porenzahl / cm^2 ± SD		
16,86 ± 3,71	3,49 ± 2,35	1,93 ± 2,22

1.3. Beschreibung des Apparates

Der Filtrationsapparat ist schematisch aufgezeichnet in Abb. 3. Er ist nach den von Schmid-Schönbein (115) angegebenen Maßen angefertigt worden.

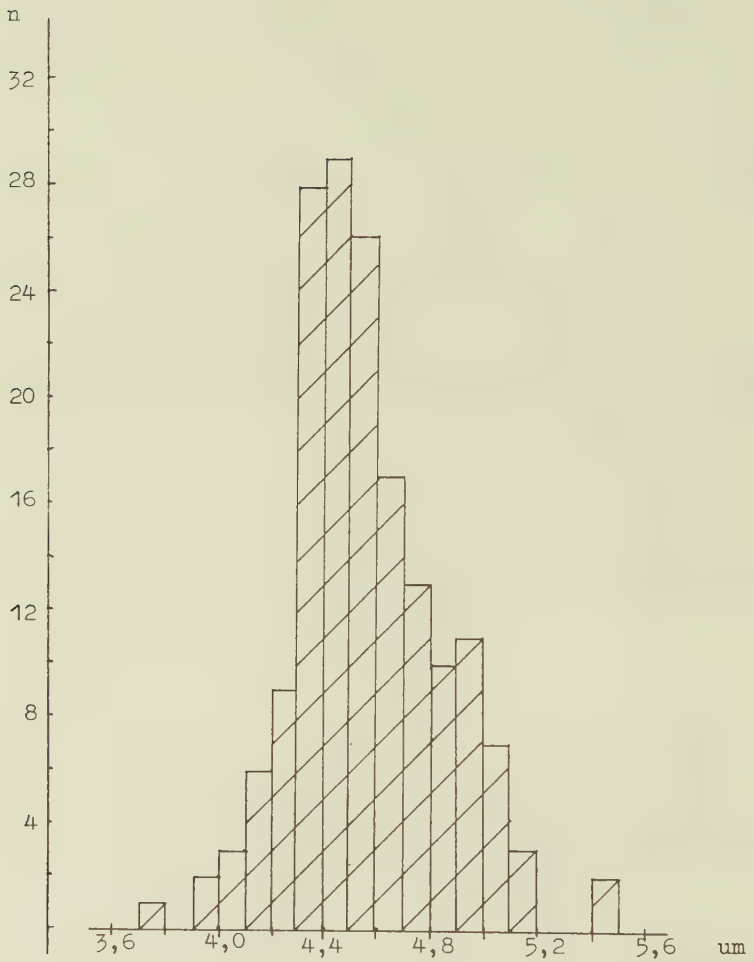


Abb. 1. Porenweite der Nuclepore^{R}-Siebe
(Porenweite in µm, n = 163, $\bar{x}$ = 4,50 µm,
SD = 0,28 µm)

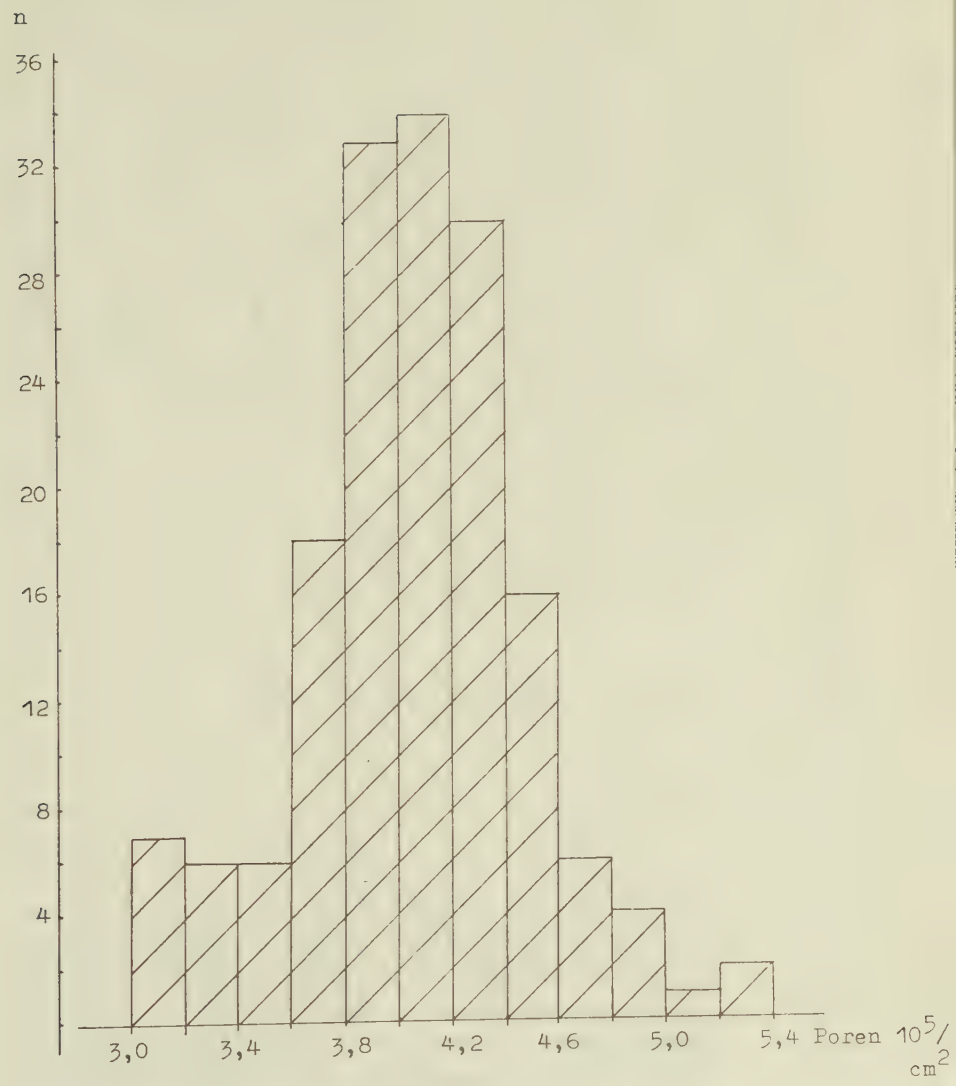
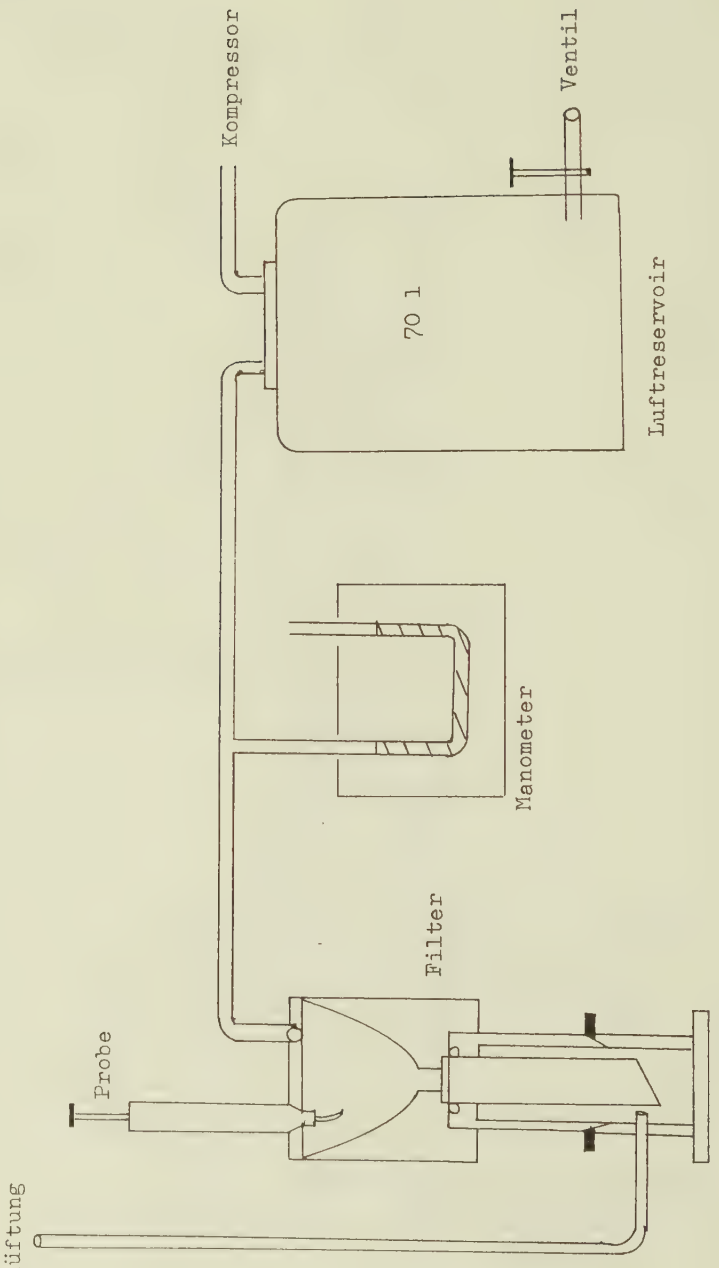


Abb. 2. Verteilung der Porenanzahl
(Poren in 10^5 / cm^2, n = 163, $\bar{x}$ = 4,0,
SD = 0,427)

Abb. 3. Schematische Darstellung des Filtrationsapparates



Das Nuclepore^{R}- Sieb mit seinem Durchmesser von 13 mm ist mit einem Gummiring zwischen einer oberen und unteren Meßkammer fest eingespannt. Der obere Teil der Meßanordnung, in den die zu messende Suspension eingegeben wird, läuft trichterförmig auf einen 3mm hohen und 2 mm breiten zylindrischen Tunnel zu. Unter diesem Teil der Anordnung, direkt über dem eingespannten Sieb, erweitert sich die obere Meßkammer zu einem Raum, der die Höhe von 0,1 mm und den Durchmesser von 7 mm hat. Da der Boden dieser Kammer das Sieb selbst ist, haben wir also eine Filterfläche von 38,5 mm^2. Unter dem Filter schließt sich ein zylindrisches Rohr mit 5 mm Durchmesser an, an das ein Auffanggefäß gesteckt werden kann.

Der obere Teil der Meßeinheit hat zwei Eingänge: 1. eine Öffnung zum Einbringen der Suspension mit Hilfe einer Spritze, 2. einen Eingang zur Erzeugung eines konstanten Filtrationsdruckes über der Siebfläche von 5 cm H_2O.

Der Druck wird mit Hilfe eines Kompressors in einem etwa 70 l großen Gefäß erzeugt, wobei der Druck mit einem Ablaßventil eingestellt wird. Durch eine Verbindung zwischen der oberen Meßeinheit und dem Druckgefäß läßt sich ein konstanter Druck über der Filterfläche aufbauen, der auch nicht durch das kleine Volumen der einzubringenden Suspension verändert wird. Der Druck wird im Nebenschluß mit einem Maometer gemessen. Das Auffanggefäß trägt ein Ventil, das mit der Luft in Verbindung steht. Die beschriebene Meßeinheit ist aus Plexiglas hergestellt. Sie ist wasserdicht, kann daher in ein Wasserbecken zur Konstanterhaltung der Temperatur eingebracht werden.

Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 37 C und einem Filtrationsdruck von 5 cm H_2O vorgenommen.

1.4. Eichung des Apparates mit einer Dextranlösung

Da vorhergehende Messungen gezeigt haben, daß ohne Überprüfung des Flußverhaltens in einem neuen oder gereinigten Sieb keine reproduzierbaren Ergebnisse von Suspensions- oder Plasmafiltrationen zu erzielen waren, wurde eine Eichung des Apparates vor jeder Messung notwendig. Als geeignete Eichflüssigkeit wurde eine Dextranlösung (Rheomacrodex 10 % ^{R} der Fa. Knoll AG, Ludwigshafen) gewählt. Wasser und physiologische Kochsalzlösung fanden keine Verwendung, da ihre zu messende Flußzeit zu klein und fehlerhaft war.

Die erhaltenen Ergebnisse der Dextranfiltrationen gibt die Tab. 2 wieder.

Tab. 2 Ergebnisse der Dextranfiltrationen

Anzahl der Dextranfiltrationen n	durchschnittliche Flußrate V_{Rheo} in µl/sec	Standardabweichung in µl/sec
613	30,22	4,96

Vor jeder Suspensions- oder Plasmamessung wurde der Filtrationsapparat mit einer Dextranmessung geeicht. Fiel die V_{Rheo} aus dem in Tab. 2 wiedergegebenen Meßbereich heraus, wurde der Filter noch einmal gereinigt oder auch verworfen. War die Dextranmessung im Bereich der Streuung größer oder kleiner als 30 µl/sec, wurde der darauf erhaltene Suspensions- oder Plasmawert auf den Normal-Dextran-Wert (30 µl/sec) umgerechnet.

Alle Suspensions- oder Plasmamessungen wurden mindestens doppelt durchgeführt.

Durch dieses Vorgehen konnte der Zustand des Siebes vor jeder Messung überprüft werden, was zu reproduzierbaren Werten führte.

2. Präparation der Blutproben

Venöses Blut wurde gesunden Erwachsenen unter leichter Stauung entnommen. Als Antikoagulans wurde Natriumäthylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet. Die Proben wurden 10 Minuten bei 3000 + g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgesaugt und durch Filter mit dem Porendurchmesser 1,2 µm (Millipore filter type RA) geschickt. Wegen der bekannten störenden Einflüsse (58) wurde von der Blutsäule das Leukozytenhäutchen entfernt. Dieser Vorgang wiederholte sich nach nochmaliger Zentrifugation. Durch Pippetieren wurden aus dem Plasma und den Erythrozyten Suspensionen vom gewünschten Hämatokrit hergestellt.

Die Filtrationsversuche wurden innerhalb von 4 Stunden nach der Blutentnahme vorgenommen.

An dieser Stelle sei ein Hinweis auf die Eignung verschiedener Blutsorten für die Filtrationstechnik eingeschoben.

Heparinfrischblut zeigt nach 3 - 4 Stunden im mikroskopischen Bild vermehrt Stechäpfelformen der Erythrozyten. Darauf wiesen schon Berichte anderer Untersucher hin (113, 114). Eigene Erfahrungen bestätigten dies. Filtrationsversuche erbrachten keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Der Nachteil von ACD-Blutkonserven ist der, daß hier schon eine Verdünnung des Blutes erfolgte. Plasmafaktoren, die einen Einfluß auf die Verformbarkeit von Erythrozyten nehmen könnten, werden dadurch in ihrer Konzentration vermindert.

E_{DTA}, das in dem gesteckten Zeitraum von 4 Stunden zwischen Blutentnahme und Verarbeitung des Blutes keine Veränderungen der roten Blutkörperchen bewirkt und zu keiner Verdünnung des Plasmas führt, erscheint als das geeignete Antikoagulans.

3. Einflußgrößen, Standardisierung

Verschiedene Faktoren nehmen einen Einfluß auf das Filtrationsverhalten von Erythrozytensuspensionen, ausgedrückt in verschiedenen Filtrationsraten. Um eine Standardisierung der verwendeten Methode zu erreichen, wurden Filtrationen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

3.1. Hämatokrit

Gregersen et al. (53) berichteten als erste über das Flußverhalten von Erythrozytensuspensionen durch Polycarbonat-Siebe. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß bei Verwendung von Sieben mit einem mittleren Porendurchmesser von 4,5 µm der Widerstand des Siebes, ausgedrückt als Quotient aus dem Druckgradienten und der Flußrate, bei gegebenen Hämatokrit konstant ist. Die Flußgeschwindigkeit nimmt mit steigendem Hämatokrit ab.

Da in den hier gemachten Versuchen keine Albuminlösung (53), sondern Eigenplasma als Suspensionsmittel verwendet wurde, ist das Flußverhalten in Abhängigkeit vom Hämatokrit nochmals untersucht worden. Es wurden Suspensionen von verschiedenen Hämatokrit hergestellt und gefiltert. Der Filtrationsdruck, der pH und die Temperatur wurden konstant gehalten.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4 wiedergegeben.

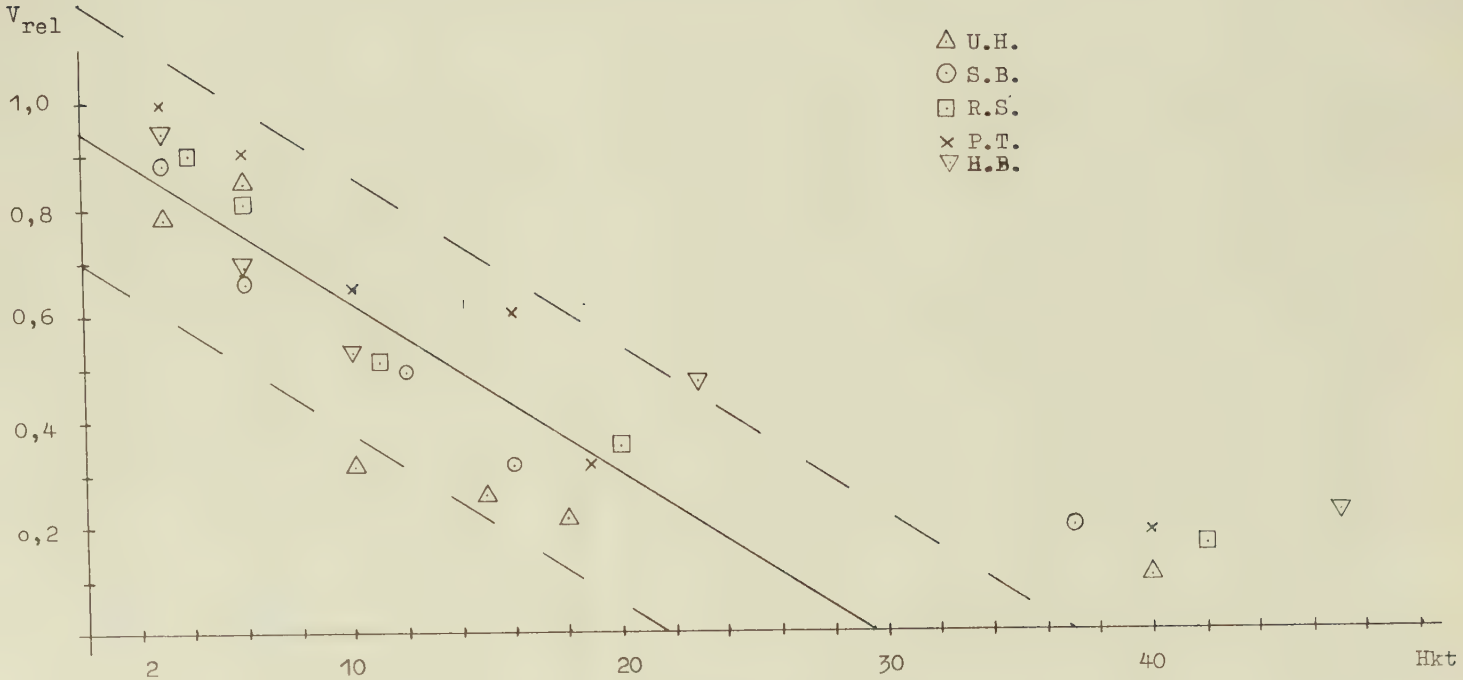


Abb. 4. Filtrationsergebnisse bei verschiedenem Hämatokrit
(y = 0,94 – 0,032 x; r = 0,812; SD = 0,247)

Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden die Werte bei einem Hämatokrit von 37 - 45 % nicht verwendet. Wie Abb. 4 zeigt, liegen die Filtrationsraten bei diesen Hämatokritwerten im gleichen Bereich. Es ist keine Abhängigkeit der relativen Flußrate vom Hämatokrit in diesem Bereich erkennbar. Als Grund dafür sind Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Protein-Interaktionen zu diskutieren, d.h., bei diesem Hämatokrit kann es zu Erythrozytenaggregaten kommen, die eine Verformbarkeitsmessung mit der verwendeten Filtrationstechnik stark beeinflussen. Bei diesen hohen Hämatokritwerten ist keine Aussage über die Deformabilität der Erythrozyten mit der verwendeten Methode möglich.

Nach Abb.4 ist ein Hämatokrit um 10 % der Bereich, in dem eine Aussage über die Verformbarkeit der Erythrozyten gemacht werden kann. Hier ist eine aggregatfreie Suspension möglich. Der Erythrozyt als verformbares Blutkörperchen bestimmt hier die Flußrate der Suspension. In den noch zu schildernden Versuchen wurden darum Suspensionen vom Hämatokrit 10 % verwendet.

3.2. pH und Sauerstoffsättigung

Wie Murphy (85), Gross (54) und Schmid-Schönbein (113, 114, 115) schon beschrieben haben, ist die Filtrabilität der Erythrozyten von der Wasserstoffionenkonzentration (pH) der Suspension abhängig. Die Verformbarkeit der Erythrozyten nimmt mit sinkendem pH ab. Die Verkleinerung der Filtrationsrate mit sinkendem pH ist von Blutspender zu Blutspender verschieden. Auch im alkalischen Milieu ist eine Abnahme der Filtrierbarkeit festgestellt worden (6).

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration zu untersuchen, wurden die in Abb. 5 wiedergegebenen Versuche durchgeführt.

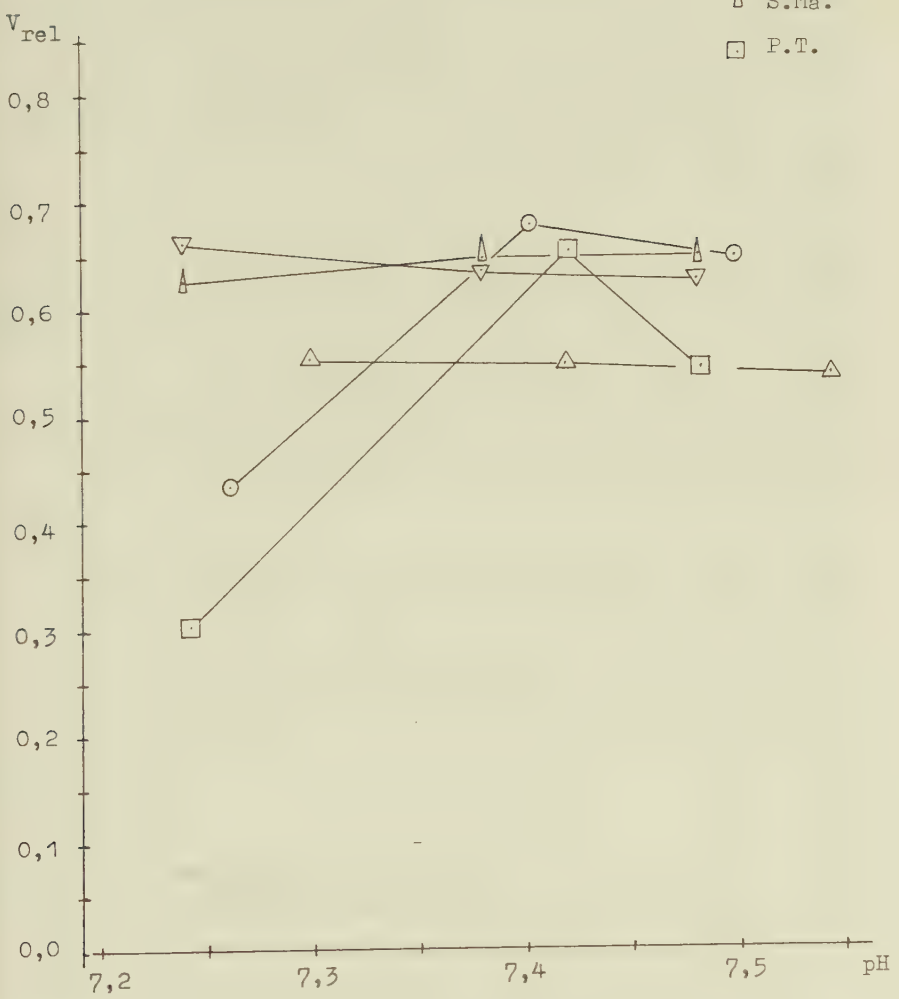


Abb. 5. Filtrationsergebnisse bei verschiedenem pH

Die pH-Werte wurden mit Hilfe von Gasgemischen mit wechselndem Kohlendioxidgehalt eingestellt. Das restliche Volumen in den Gasflaschen war mit Sauerstoff gefüllt. Die Erythrozytensuspensionen mit dem Hämatokrit von 10 % wurden in ein Tonometriergefäß eingebracht und unter Schütteln mit dem mit Wasserdampf gesättigten Gasgemisch bei 37 C in Kontakt gebracht. Der pH-Wert wurde mit einer Glaselektrode (Fa. Deutsche Metrohm) gemessen.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und auch die Sauerstoffsättigung haben großen Einfluß auf die Erythrozytenfiltrierbarkeit (106). Mit sinkendem pO_2 nimmt die Verformbarkeit der Erythrozyten ab. Mehrere Gasanalysen ergaben, Daß die O_2-Sättigung der Suspensionen immer 100 % war. Durch Sättigung der Suspensionen mit Sauerstoff kann man die verwendete Methode in dieser Beziehung als standardisiert ansehen.

Abb. 5 zeigt, daß die in früheren Untersuchungen (s.o gemachten Beobachtungen bestätigt werden konnten.

In den folgenden Versuchen wurde immer ein pH von 7,40 $\pm$ 0,02 eingestellt. Das Blut wurde mit Sauerstoff gesättigt.

3.3. Fibrinogen

Da die Literatur (103, 125) keine klare Antwort auf die Frage gibt, ob Plasmafibrinogen die Flexibilität von Erythrozyten beeinflußt, fand dieses Problem in der methodischen Entwicklung seine Beachtung. Das Plasmafibrinogen wurde nach der Methode von Clauss (29) bei jedem Probanden bestimmt.

In Abb. 6 ist die relative Flußrate V_{rel}, als Maß der Verformbarkeit der Erythrozyten, in Abhängigkeit von der Plasmafibrinogenkonzentration wieder-

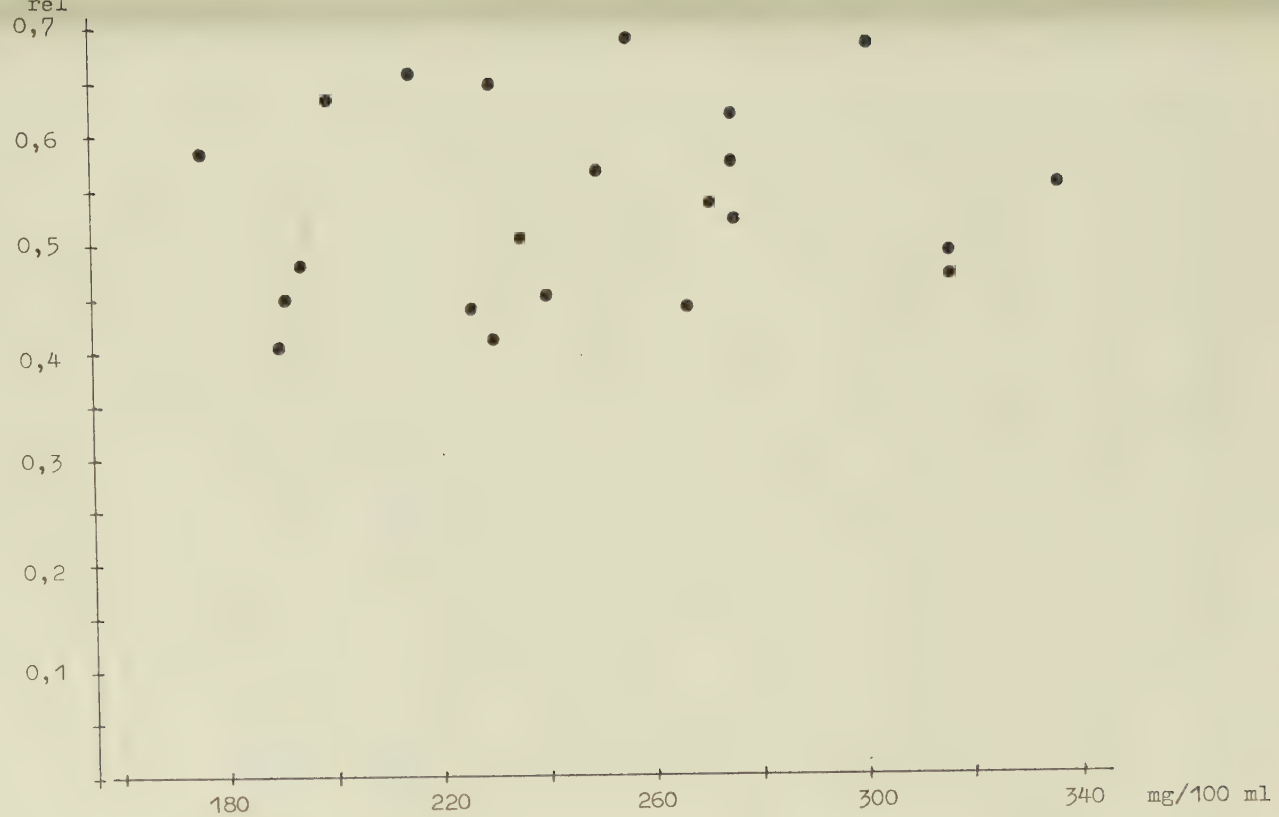


Abb.6. Filtrationsergebnisse bei verschiedenen Fibrinogenkonzentrationen des Plasmas

gegeben. Es ist keine Beeinflussung der Filtrabilität durch die Fibrinogenkonzentration erkennbar.

Der Auffassung von Reid (103), daß die sich widersprechenden Ergebnisse in dieser Frage auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen sind, ist nach den erhaltenen Erfahrungen zuzustimmen. Bei den geringen Kräften, die in der geschilderten Filtrationstechnik im Gegensatz zu Sirs (124) "Automatic Recording Centrifuge" auf das rote Blutkörperchen einwirken, ist keine Beeinflussung durch das Fibrinogen registrierbar.

3.4. MCV, MCHC und Osmolarität

Je höher das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) der Erythrozyten, desto schwieriger ist es für sie, die kleinen Poren der Polycarbonat-Siebe zu passieren, die Filtrationsrate nimmt ab. Jandl (62) und Murphy (85) brachten die Erythrozyten in einer hypotonen Lösung zur Schwellung, das MCV erhöhte sich, und die Filtrationsrate verkleinerte sich. Murphy (85) brachte rote Blutkörperchen in hypertone Lösungen ein, was zu einer Schrumpfung der Erythrozyten und einer Erhöhung der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) führte. Die Filtrationsrate nahm ab.

Diese Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der Isotonie des Suspensionsmittels für die funktionelle Intaktheit der Erythrozyten.

In den eigenen Untersuchungen wurden die Erythrozyten in Eigenplasma suspendiert. Die Isotonie wurde vorausgesetzt. Das MCV und die MCHC wurden durch einen Coulter-Counter bestimmt. Die Messungen ergaben für das MCV 82 $\pm$ 8 um^3 und für die MCHC 33 $\pm$ 3 g Hb / 100 ml Erythrozyten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung bei n = 31).

Einen Zusammenhang zwischen MCV und MCHC in dem wiedergegebenen Bereich und der Filtrierbarkeit von Erythrozytensuspensionen konnte man nicht erkennen.

3.5. Bestimmung des Meßfehlers

Um den Meßfehler zu bestimmen, der 1. durch die verwendete Methode, 2. durch die Reaktion des Messenden und 3. durch Schwankungen in der Vorbereitung der Erythrozytensuspensionen bedingt ist, wurde mehreren Probanden eine größere Menge Blut entnommen und die in Tab. 3 wiedergegebenen Versuche unternommen. Aus dem Blut eines einzelnen Probanden wurden 4 oder 5 Suspensionen mit dem Hämatokrit 10 % hergestellt. Es erfolgten mehrere Filtrationen von Suspensionen und Plasma. Die genauen Zahlen sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Die Streuung der V_{rel} von 12,5 bis 23,4 % des Mittelwertes ist sicherlich durch die für die Versuche in Anspruch genommene Zeit bedingt. Etwa eine Stunde nach der Blutentnahme konnte die erste Suspension gefiltert werden. Zwischen diesem Versuch und der Messung der letzten Suspension verstrichen bis zu 2 1/2 Stunden. Die Erythrozyten wurden in dieser Zeit in einem Wasserbad bei 37 C aufbewahrt. Ein Effekt der Inkubation auf die Erythrozytenverformbarkeit ist zu diskutieren. Da in den hier durchgeführten Untersuchungen, im Gegensatz zu den Versuchen unter III.2. dieser Arbeit, die Zeit nicht genau registriert wurde, wird die Besprechung dieses Effektes dort vorgenommen.

Tab. 3 Bestimmung des Meßfehlers

Proband	Anzahl der Suspensionen	Hämatokrit ± SD	V_{Susp} ± SD	Anzahl der Susp.Filtr.	V_{Plasma} ± SD	Anzahl der PlasmaFiltr.	V_{rel} ± SD	% Streuung
H.B.	4	9,0 ± 0,5	32,70 ± 5,06	10	51,55 ± 2,41	3	0,634 ± 0,098	15,5
B.B.	5	9,5 ± 1,0	34,00 ± 6,04	9	61,44 ± 4,26	8	0,553 ± 0,098	17,7
R.S.	5	9,5 ± 1,0	35,84 ± 4,41	10	60,81 ± 4,51	7	0,576 ± 0,072	12,5
U.H.	4	10,0 ± 0,5	36,30 ± 5,72	11	81,54 ± 9,81	7	0,445 ± 0,070	15,7
H.N.	4	9,0 ± 0,0	26,12 ± 6,08	9	56,50 ± 4,70	4	0,462 ± 0,108	23,4

3.6. Normalbereich

Zur Festlegung des Normalbereiches der Erythrozytenverformbarkeit, ausgedrückt in der relativen Flußrate V_{rel}, wurde Blut von 14 gesunden Personen mit der Filtrationsmethode untersucht. Dabei dienten einige Blutspender 2 - 3 mal als Testperson, so daß insgesamt 31 Messungen zur Bestimmung des Normalbereiches vorgenommen wurden. Aus den Werten der Spender, die mehrmals untersucht wurden, wurde der Mittelwert gebildet, und dieser wurde für die in Tab. 4 wiedergegebenen Statistik benutzt.

Als variable Einflußgrößen wurden bei den Messungen bestimmt: 1. die Wasserstoffionenkonzentration (pH), 2. der Filtrationsdruck und 3. der Hämatokrit (Hkt). Die ermittelten Werte werden in der Tab. 4 wiedergegeben. Außerdem wurde mit Hilfe eines Coulter-Counter das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) bestimmt. Diese Werte bewegten sich im Normbereich für einen erwachsenen Menschen. Ebenfalls als normal erwiesen sich die Ergebnisse von Fibrinogen- und Gesamteiweißbestimmungen, die auch durchgeführt wurden. Die Isotonie wurde vorausgesetzt, da Eigenplasma ohne Zusätze verwendet wurde, was zu keiner Veränderung des MCV oder MCHC führte. Die Anfertigung und Betrachtung eines Blutausstrichs ergab keine morphologischen Abweichungen der Erythrozyten.

Die Suspensions- und Plasmafiltrationen wurden mindestens dreifach bei jeder Testperson vorgenommen.

Der Normalbereich der relativen Flußrate als Maß für die Verformbarkeit der Erythrozyten liegt unter den genannten standardisierten Bedingungen bei $0{,}555 \pm 0{,}114$ ($x \pm 2$ SD).

Tab. 4 Normalbereich

	Anzahl der Probanden	$V_{Susp} \pm SD$ in µl/sec	$V_{Plasma} \pm SD$ in µl/sec	$V_{rel} \pm 2\ SD$
	14	33,49 ± 4,32	60,80 ± 6,44	0,555 ± 0,114
% der Streuung		12,90	10,59	10,27

pH 7,39 ± 0,02; ΔP 5 cm H_2O; Hkt 10,0 ± 1,0 %

4. Diskussion zur Filtrationstechnik

Ähnliche Untersuchungen mit der Filtrationstechnik finden sich in der Literatur (115, 133). In diesen Arbeiten werden unter vergleichbaren Bedingungen Flexibilitätsbestimmungen durchgeführt. Die Maße der Apparatur und damit auch die Größe der Filterfläche sind die gleichen wie in dieser Arbeit. Als Filter werden Polycarbonat-Siebe benutzt. Der Filtrationsdruck beträgt 5 cm H_2O. Es werden Erythrozytensuspensionen unter Verwendung von Eigenplasma mit einem Hämatokrit von 10 % gefiltert. Der pH-Wert wird auf 7,4 und die Temperatur auf 37 C eingestellt.

Beide Untersucher kommen zu ähnlichen Meßergebnissen und Normalbereichen. Der Bereich der Streuung ist ungefähr der gleiche, die erhaltenen Meßdaten weichen aber auseinander (Tab. 5).

Zu diskutieren ist die Frage, warum die Filtrationsraten des Plasmas und der Suspensionen in der hier verwandten Methode kleiner sind als bei den anderen Untersuchern.

Tab. 5 Vergleichswerte mit anderen Studien

	V_{Plasma} (µl/sec)	V_{Susp} (µl/sec)	V_{rel}
Eigene Ergebnisse	60,8o ± 6,44	33,49 ± 4,32	0,555 ± 0,057
Schmid-Schönbein (115)	75,70 ± 12,91	52,11 ± 8,51	o,685 ± 0,059
Tillmann (133)	83,14 ± 13,98	54,32 ± 4,02	nicht bestimmt

Die Gründe für die Verkleinerung der Flußrate sind in den Abweichungen beim methodischen Vorgehen zu suchen. Der erste Unterschied ist in der Aufbereitung des Blutes zu finden. Schmid-Schönbein (115) und Tillmann (133) stellen den pH mit Hilfe eines Puffers auf 7,4 ein, der über eine semipermeable Membran mit der Suspension in Kontakt gebracht wird. In dieser Studie erreicht man den gewünschten pH durch Äquilibrieren der Suspension mit einem CO_2/O_2 - Gasgemisch. Dieser Vorgang vollzieht sich unter 3 - 4 minutigem Schütteln der Suspension in einem Tonometriergefäß. Ob durch diesen Vorgang traumatische Effekte auf einzelne Erythrozyten bedingt sind, die dann verschiedene Filterporen verstopfen und die Filterfläche dadurch verkleinern, bleibt ungeklärt.

Ein zweiter Unterschied zu den geschilderten Arbeiten ist der Zustand des Siebes vor der Plasma- oder Suspensionsfiltration. Während Schmid-Schönbein und Tillmann ihre zu messenden Flüssigkeiten durch ein trockenes Polycarbonat-Sieb schicken, ist der Filter in dieser Studie durch den vorher durchgeführten Eichprozeß mit einer Dextranlösung angefeuchtet. Aus dieser Tatsache ergibt sich sicherlich eine Beein-

flussung des Fließverhaltens von Plasma oder Suspensionen.

Aus den zwei geschilderten Punkten ist zu entnehmen, daß sich durch Veränderungen in der Methodik eine Verschiebung des Normalbereiches ergibt. Ein Vergleich der Streubereiche zeigt aber, daß das Vorgehen nach Schmid-Schönbein und auch das hier gebrauchte Verfahren reproduzierbare Ergebnisse liefert.

In dieser Diskussion zur Filtrationstechnik müssen einige Bemerkungen zur methodischen Untersuchung von Leonhardt et al. (75) gemacht werden. Er vertritt die Auffassung, daß Bestimmungen der Erythrozytenverformbarkeit mit der Filtrationsmethode nur dann eine Aussagekraft besitzen, wenn gleichzeitig eine Viskositätsmessung des Plasmas vorliegt. Er begründet dies mit dem von ihm beschriebenen Einfluß des Fibrinogens und des g-Globulins auf die Verformbarkeitsmessungen mittels einer Filtrationsmethode. Diesen Effekt wies er nach, indem er die Erythrozyten in unterschiedlichen Fibrinogenlösungen und in Seren mit verschiedenen g-Globulinkonzentrationen suspendierte. Da in den hier wiedergegebenen Versuchen Eigenplasma als Suspensionsmittel verwendet wurde, scheint die Plasmaviskositätsbestimmung nicht notwendig zu sein. Denn Fibrinogen- und Gesamteiweißbestimmungen ergaben bei den untersuchten Suspensionen Werte, die im Normalbereich für einen Erwachsenen liegen (Fibrinogen 175 - 330 mg/100 ml, Gesamteiweiß 6,8 - 7,8 g/100 ml). Außerdem wurde gezeigt (siehe unter 3.3.), daß in dem wiedergegebenen Bereich kein Zusammenhang zwischen der Fibrinogenkonzentration und der Filtrierbarkeit besteht. Die verwendete Methode mit Eigenplasma als Suspensionsmittel besitzt auch ohne eine Plasmaviskositätsbestimmung seine Aussagekraft.

Wie in der Einleitung unter 2.2. schon ausgeführt, wird die Verformbarkeit durch drei Faktoren bestimmt: 1. Zellgeometrie, 2. zytoplasmatische Viskosität und 3. Membraneigenschaften (4, 11, 28, 46, 79, 83, 84).

Veränderungen eines dieser Faktoren führt zu einer Flexibilitätsveränderung. Welche Änderung der Zelleigenschaften durch die Filtration erfaßt wird, war Gegenstand mehrerer Äußerungen in der Literatur. Während Chien (28) die Erfassung von Änderungen in der Zellgeometrie und der Zellviskosität beschreibt, billigt Mohandas (83) der Filtration nur die Erfassung von Änderungen der Zellgeometrie zu. Rusch (106) nimmt Änderungen der Membraneigenschaften bei normalem Hämoglobin und Veränderungen der Viskosität des Zellinhaltes bei instabilem Hämoglobin durch Filtrationsverfahren wahr. Die widersprüchlichen Äußerungen zeigen, daß die Filtration allein keine Aussage über die Veränderung eines der drei verformbarkeitsbestimmenden Faktoren zuläßt. Erst durch Kombinationen mit anderen Verfahren (z.B. Viskosimetrie, Zentrifugation, Mikropipette, Fixation, Diffraktiometrie) ist eine abschließende Differenzierung möglich (45).

III. Bestimmung der Verformbarkeit von Erythrozyten nach Inkubation mit Bilirubin

Wie unter Punkt 2.3.2. der Einleitung schon dargelegt wurde, ist es die Aufgabe dieser Arbeit, die Beeinflussung der Verformbarkeit von Erythrozyten in einem bilirubinhaltigen Medium zu untersuchen.

1. Methodisches Vorgehen

1.1. Zusatz von Bilirubin zu den Erythrozytensuspensionen

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde Bilirubin p.a. der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Die zu messenden Erythrozytensuspensionen sollten Bilirubin in der Konzentration von 4 mg % enthalten.

Bilirubin ist im physiologischen pH-Bereich wasserunlöslich. Um eine Löslichkeit des Bilirubins zu erreichen, muß der pH-Wert des Mediums auf 8,0 angehoben werden. Diese Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration ist in dieser Studie unerwünscht (siehe II.3.2.). Daher wurden 12 mg Bilirubin erst in 1ml 0,1 N NaOH gelöst. 10 µl dieser Bilirubinlösung wurde dann in die zu messende Erythrozytensuspension (3 ml) eingebracht (93). Parallel wurde ein Leerwert mitgeführt, der die gleiche Menge Natronlauge enthält ohne Zusatz von Bilirubin.

Der pH-Wert der Suspension veränderte sich dabei nur geringfügig (max. pH $\pm$ 0,2).

1.2. Inkubation der Suspension bei 37 C, Inkubationsdauer

Sofort nach Zugabe des Bilirubins, bzw. der Natronlauge wurden die Suspensionen in ein Wasserbad mit 37 C Temperatur eingebracht.

Mit der Filtrationstechnik wurde bei jeder Versuchsserie zuerst die Verformbarkeit der Erythrozyten bestimmt, die in Eigenplasma ohne Zusätze suspendiert waren.

Die erste Filtration von bilirubin- oder natronlauge-enthaltenden Suspensionen erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten. Die weiteren Messungen erfolgten nach 60, 120 und 180 Minuten.

1.3. Waschen der Erythrozyten nach Inkubation

Nach einer Inkubationsdauer von 18o Minuten wurde eine bilirubinenthaltende (Hauptwert) und eine natronlaugeenthaltende (Leerwert) Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dabei wurde die Suspension (3 ml) mit 6 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und mehrmals geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Dieses Vorgehen wiederholte sich zweimal. Die verbleibenden gewaschenen Erythrozyten wurden mit Eigenplasma resuspendiert. Die Suspensionen hatten einen Hämatokrit von 10.

Die Verformbarkeit dieser gewaschenen Erythrozyten wurde ebenfalls mit der Filtrationstechnik bestimmt.

1.4. Bestimmung des Bilirubins im Plasma

Bei jeder mit Bilirubin versetzten Probe wurde der Farbstoffgehalt mit einer Micromethode bestimmt (63).

Die mittlere Gesamtbilirubinkonzentration betrug 4,4 mg % (SD $\pm$ 0,5 mg %).

1.5. Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma nach Inkubation mit Bilirubin und NaOH

Frühere eigene Versuche haben gezeigt, daß stark hämolytisches Plasma die Filtrationszeit verlängert.

Gleichzeitig ist bekannt, daß Bilirubin in vitro eine Hämolyse bewirkt (69, 93).

Um das Ausmaß der Hämolyse in den vorher genannten Versuchen quantitativ zu erfassen, wurde nach dreistündiger Inkubation das freie Hämoglobin im Überstand bestimmt. Dabei wurde eine Testkombination der Fa. Boehringer in Anlehnung an die Methode von E.J. van Kampen und W.G. Zijlstra (101) benutzt.

In 5 Versuchen wurde nach Zentrifugieren ein Teil des Überstandes sowohl einer Erythrozytensuspension mit Bilirubin als auch der zugehörigen Probe mit 0,1 N Natronlauge abgesaugt. Dieses Material wurde zur Bestimmung des freien Hämoglobins benutzt.

In den bilirubinenthaltenden Ansätzen wurden Werte zwischen 6,6 und 15,5 mg Hämoglobin / 100 ml Serum gemessen (Mittelwert 9,5 mg/100 ml). In den NaOH-enthaltenden Proben lagen die gemessenen Werte zwischen 6,6 und 13,9 mg/100 ml (Mittelwert 9,5 mg/100 ml).

Die Versuche zeigen, daß bei einer mittleren Bilirubinkonzentration von 4,4 mg/100 ml Serum und einer Inkubationszeit von 3 Stunden gegenüber einem Leerwert keine größere Hämolyserate zu erwarten ist.

2. Filtration von bilirubininkubierten Erythrozytensuspensionen im Vergleich zu einem Leerwert

Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der Filtrationsversuche, die durchgeführt wurden mit:

1. Erythrozytensuspensionen ohne Zusätze,
2. Suspensionen mit Zusatz von Bilirubin, gelöst in 0,1 N Natronlauge (s.1.1.),
3. Suspensionen mit Zusatz einer gleichen Menge 0,1 N Natronlauge ohne Bilirubin (s.1.1.) und
4. Suspensionen, die Bilirubin oder Natronlauge enthielten und nach dreistündiger Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden (s.1.3.).

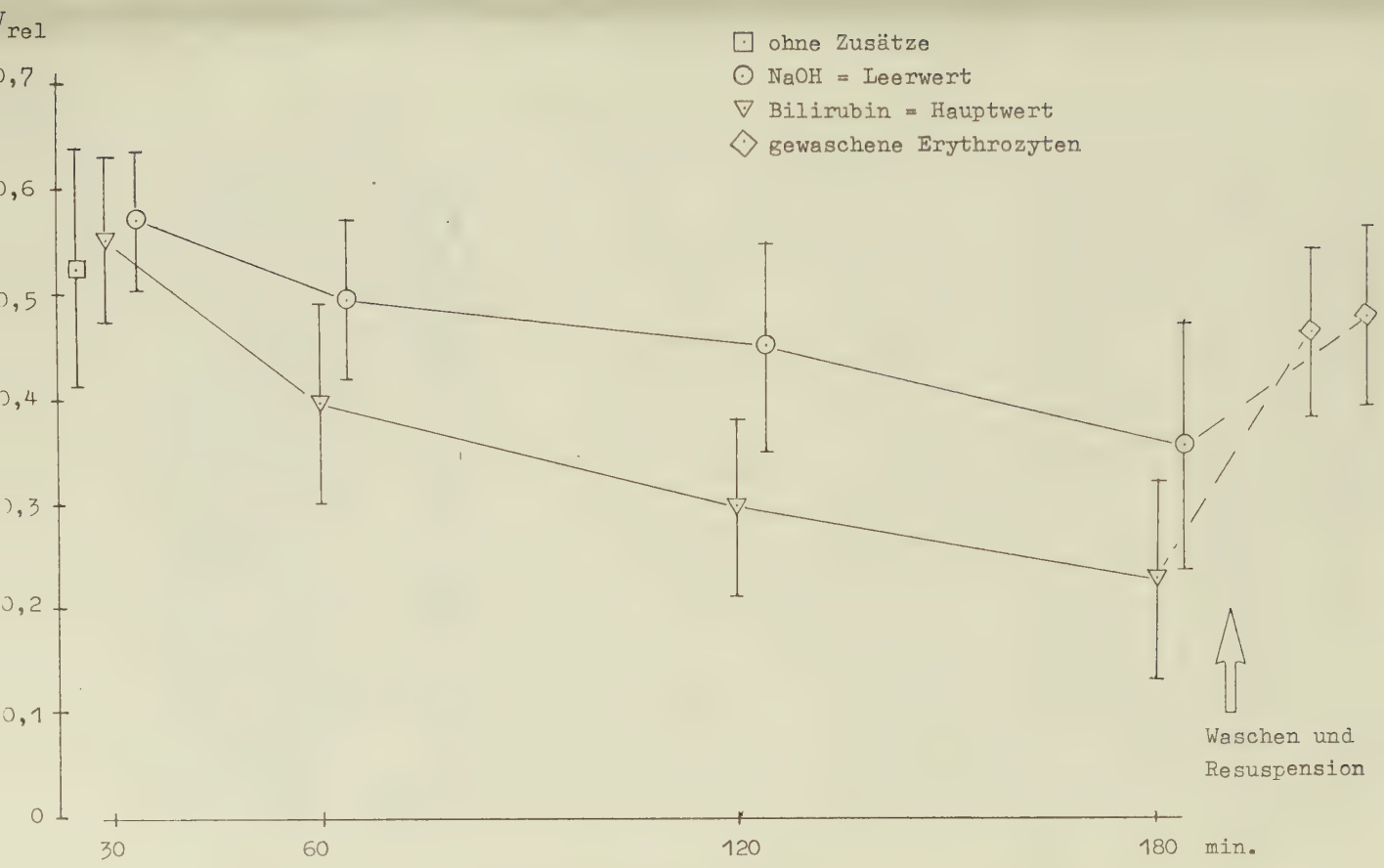


Abb. 7. Ergebnisse der Filtrationen nach Inkubation mit und ohne Bilirubin.

Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind wiedergegeben, die sich aus Messungen der Erythrozytenverformbarkeit von 10 gesunden Probanden ergaben.

Die Mittelwerte des Hauptwerts und des Leerwerts wurden mit Hilfe eines t - Tests (107) miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn t größer ist als das einer Tabelle (107) entnommene kritische t für den jeweiligen Stichprobenumfang. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Mittelwerten wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner war als 5 % ($p<0,05$).

Im t - Test zeigte sich kein Unterschied zwischen Haupt- und Leerwert nach einer Inkubationsdauer von einer halben Stunde. Ebenfalls fand sich kein Unterschied zwischen diesen Werten und den Messungen ohne Zusätze.

Einen signifikanten Unterschied im t - Test ergab der Vergleich des Haupt- und Leerwerts nach einer Inkubationsdauer von 60, 120 und 180 Minuten (t für 1 Stunde: 2,6; t für 2 Stunden: 3,6; t für 3 Stunden: 2,7). Die Abnahme der Verformbarkeit in einem bilirubinenthaltenden Milieu ist demnach im Vergleich zu einem Leerwert nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde und mehr größer.

Gleichzeitig erkennt man aus Abb. 7, daß mit zunehmender Inkubationsdauer die relative Flußgeschwindigkeit als Maß der Verformbarkeit der Erythrozyten auch im Leerwert abnimmt. Diese Beobachtung wird hier erwähnt, um die im Abschnitt II.3.5. wiedergegebene große Steubreite der Messungen bei einem Probanden zu erklären. Die dort genannte Vermutung, daß die Zeit, die zwischen Blutentnahme und Messung der Filtrationszeit verstreicht, einen Einfluß auf die Meßwerte hat, findet hier ihre Bestätigung.

3. Filtration von gewaschenen Erythrozytensuspensionen

Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der Filtrationen von Erythrozytensuspensionen, die nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden mit dem im Abschnitt 1.3. beschriebenen Verfahren vorbehandelt wurden.

Die gemessenen Mittelwerte wurden mit den zugehörigen Mittelwerten des Bilirubin- und NaOH-Versuchs nach 1/2 und nach 3 Stunden in einem t - Test verglichen. Dieser ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem Hauptwert nach 3 Stunden und dem Ergebnis nach dem Waschprozeß ($t = 5{,}1$; $p<0{,}001$). Dagegen bestand kein Unterschied zwischen dem Leerwert nach drei Stunden und dem Wert nach Waschen der NaOH-inkubierten Erythrozyten. Es konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen dem Haupt- und Leerwert nach einer halben Stunde Inkubationszeit und dem Mittelwert der gewaschenen Erythrozytensuspensionen gefunden werden.

Das Auswaschen des Bilirubins und das Resuspendieren der gewaschenen Erythrozyten in normales Plasma haben demnach eine Wirkung auf das Filtrationsverhalten der Erythrozyten.

IV. Diskussion

Wie in Abschnitt III aufgezeigt, nimmt die relative Flußrate und damit die Verformbarkeit von bilirubininkubierten Erythrozyten im Vergleich zu einem Leerwert rascher ab.

Die Inkubationsdauer wurde auf 3 Stunden begrenzt, da eigene Erfahrungen und die anderer Untersucher (114) gezeigt haben, daß Blut mit EDTA als Antikoagulans im Filtrationsversuch innerhalb von 4 Stunden verarbeitet werden muß. In dieser Zeit sind keine Veränderungen der Erythrozyten erkennbar. Um den Einfluß einer Testsubstanz (Bilirubin) auf die Verformbarkeit zu untersuchen, muß man die Filtrationen in diesen Zeitraum legen.

Hämolytisches Plasma als Suspensionsmittel erhöht die Flußzeit. Dies zeigten eigene Versuche bei der Erarbeitung der Filtrationstechnik. In den von Bergentz (9) beschriebenen Filtrationsversuchen mit Blut von traumatisierten Kaninchen fand sich ebenfalls neben einer Erhöhung des freien Hämoglobins eine Abnahme der Flußrate.

Bilirubin selbst bewirkt eine Hämolyse der Erythrozyten (13, 69, 87, 93, 96). Dieser Effekt ist aber erst nach 4 Stunden Inkubationszeit anzutreffen und steigert sich nach 6 und 8 Stunden (69, 93). Daß in unseren Versuchen das freie Hämoglobin im Plasma keinen Einfluß auf das unterschiedliche Filtrationsverhalten der Suspensionen des Haupt- und Leerwerts hat, zeigt Abschnitt III.1.5. Die Bestimmung des Hämoglobins im Plasma ergab nach dreistündiger Inkubation keinen Unterschied zwischen dem bilirubinenthaltenden Hauptwert und dem Leerwert.

Auf die Abhängigkeit der Verformbarkeit der roten Blutkörperchen von deren ATP-Gehalt weisen einige Autoren hin (71, 73, 140, 141, 142, 143). Bei einer Verminderung des ATP-Spiegels (z.B. in gelagerten Erythrozyten) werden die roten Blutkörperchen steifer. Umgekehrt führt eine Erhöhung des ATP-Spiegels zu einer Verbesserung der Verformbarkeit. Dies wurde in Filtrationsversuchen mit Pentoxifyllin, das eine Erhöhung des ATP-Spiegels bewirkt, gezeigt (42, 145).

Petrich fand in seinen Untersuchungen (93) einen bilirubininduzierten schnelleren Abfall der ATP-Konzentrationen gegenüber einem Leerwert. Schon nach 2 Stunden Inkubationsdauer war dies festzustellen. Im gleichen Zeitraum fällt der Glucoseverbrauch der Erythrozyten meßbar ab. Die minimale Bilirubinkonzentration, die diese Hemmung des Glucoseverbrauches bewirkt, liegt bei 3 mg/100 ml Serum.

In unserer Studie arbeiteten wir mit einer mittleren Bilirubinkonzentration von 4,4 ± 0,5 mg/100 ml Serum. In den Versuchen wurde keine ATP-Bestimmung vorgenommen. Ein hier nur angenommener schnellerer Abfall des ATP-Spiegels in einer bilirubinenthaltenden Probe könnte aber eine Erklärung der rascheren Reduzierung der Flußrate sein.

Im Vordergrund einiger Untersuchungen zur Verformbarkeit steht die Zellmembran des Erythrozyten (4, 20, 30). Quecksilberverbindungen, die die Schwefelwasserstoffgruppen der Membranproteine angreifen, führen zu einer Abnahme der Verformbarkeit (72). Erhitzung und damit Denaturierung der Membranproteine führt zu einem Flexibilitätsverlust (99, 146). Durch Acetylphenylhydrazin erzeugte Heinzkörper versteifen die Membran und setzen dadurch die Verformbarkeit herab (135). Immunglobuline beim Plasmozytom besetzen die Oberfläche der Erythrozyten, die dadurch schlechter filtriert werden (136). Ein gestörtes Calcium / ATP - Verhältnis führt zur Versteifung der Membran (141). Viele Therapeutica, die die Verformbarkeit geschädigter Erythrozyten verbessern sollen, setzen an der Membran über verschiedene Wirkungsmechanismen an (1, 11, 32, 36, 39, 47, 48, 100, 126).

Vom Bilirubin ist bekannt, daß es ebenfalls Membranveränderungen bewirkt (s. I.1.3.5.). Durch Bindung an Phospholipide der Erythrozytenmembran ist deren Integrität gestört (66). Es kommt nicht nur zu Veränderungen der Lipidschicht, sondern auch zu Störungen des Proteinskeletts, dem der Hauptanteil an der Bestimmung der Membranverformbarkeit zugesprochen wird (83). Die Membran kann auch in den Filtrationsversuchen der "primäre Angriffspunkt des Bilirubins" sein (93).

Die in Abschnitt III.3. wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß die durch Bilirubin reduzierte Verformbarkeit nach dem Auswaschen des Farbstoffs auf normale Werte ansteigt.

Neben dem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung hat dabei das Resuspendieren der Erythrozyten in Plasma mit einer normalen Albuminkonzentration eine große Bedeutung. Die Erythrozytenbindung des Bilirubins ist abhängig vom molaren Quotienten Bilirubin zu Albumin (65). Bei Zugabe von Albumin stellt sich ein Gleichgewicht in der Bilirubinbindung zwischen Albumin und Erythrozyten ein. Wie Behrman (8) feststellt, verläßt Bilirubin bei Zusatz von Albumin Gewebszellen, die den Farbstoff enthalten. Das an die Erythrozytenmembran gebundene Bilirubin wird durch Albuminzugabe extrahiert (52). Bekannt ist der Bindungsmechanismus des Bilirubin an die Erythrozytenmembran (52, 66), jedoch nicht die Vorgänge, die durch das Bilirubin zu einer Verminderung der Verformbarkeit führen. Welche Strukturen oder Stoffwechselvorgänge reversibel geschädigt werden, bleibt unklar.

Ebenfalls offen bleibt die Frage, ob Bilirubin alle Erythrozyten oder nur die eines bestimmten Entwicklungsstadiums - junge oder alte - schädigt. Durch die Art der Suspensionsherstellung bedingt, kann keine Aussage über die unterschiedliche Beeinflussung der Verformbarkeit junger und alter Erythrozyten in dieser Arbeit gemacht werden (77).

Eine Herabsetzung der Verformbarkeit der Erythrozyten bedeutet in vivo eine verkürzte Lebensdauer der Zelle (41). Die steifen Zellen können die Milz nicht mehr passieren und werden dort abgebaut. Hinweise auf eine verkürzte Lebenszeit bei Hyperbilirubinämie finden sich in der Literatur (137, 97, 98, 121). Bei Lebererkrankungen wurde über Veränderungen von Membranlipiden eine vermehrte Hämolyse beobachtet (121). Ratten mit cholestatischem Ikterus bei operativ unterbundenem Gallengang zeigten eine verminderte Erythrozytenüberlebensdauer (98). Bei Fehlen von konjugiertem Bilirubin (Ratten mit Enzymdefekt) war die Erythrozytenlebensdauer jedoch normal, d.h., in vivo

beeinträchtigt das indirekte, nicht konjugierte Bilirubin die Erythrozyten nicht. Die Ergebnisse der vorliegenden in vitro Untersuchung zeigen eine reversible Herabsetzung der Verformbarkeit der Erythrozyten durch indirektes, nicht konjugiertes Bilirubin. Eine Verminderung der Lebensdauer der steiferen Erythrozyten ist theoretisch in vivo zu erwarten. Die Diskrepanz der in vivo- und in vitro-Befunde bleibt ohne weitere Untersuchungen ungeklärt.

V. Zusammenfassung

Toxische Wirkungen des Bilirubins auf verschiedene Gewebszellen, insbesondere auf Erythrozyten sind hinlänglich bekannt. Rote Blutkörperchen nehmen den Gallefarbstoff auf, wobei ca. 30 % an der Membran gebunden werden. Gleichzeitig wird Bilirubin im Vollblut an Albumin gebunden. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem, erythrozytengebundenem und albumingebundenem Bilirubin ein. Bilirubin führt in bestimmten Konzentrationen zur Hämolyse. Ein bilirubinabhängiger Abfall von energiereichen Phosphaten in den Erythrozyten ist bekannt. Der Gallenfarbstoff hemmt den Glucoseverbrauch. Membranveränderungen wie Hemmung der Membran-ATP-ase, Proteinveränderungen des Membranskeletts sowie Peroxidation von Membranlipiden führen zur Störung der Integrität der Erythrozytenmembran.

Thema der vorliegenden Arbeit ist der Einfluß des Bilirubins auf eine essentielle Eigenschaft des Erythrozyten, seine Verformbarkeit. Ein Verlust der Deformabilität führt in vivo zum Ausfiltern der steifen roten Blutkörperchen und deren Abbau in der Milz.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Entwicklung einer Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit geschildert. Dabei werden Erythrozytensuspensionen und zellfreies Plasma durch ein Kunststoffsieb gefiltert, das Poren mit einem mittleren Durchmesser von 5 µm aufweist. Die Erythrozyten als verformbare Teilchen bestimmen die Flußrate. Als Maß der Verformbarkeit wird eine relative Flußrate - Quotient aus den Flußraten einer Erythrozytensuspension und eines zellfreien Plasmas - angenommen. Die Filter wurden lichtmikroskopisch untersucht. Bei 163 Sieben war der mittlere Porendurchmesser 4, 50 $\pm$ 0,28 µm bei einer Porenzahl von 4,0 $\pm$ 0,43 x 10^5 Poren/cm^2. Zur Erreichung von reproduzierbaren Ergebnissen war vor jeder Erythrozyten- oder Plasmafiltration eine Eichung des

Filtrationsapparates mit einer Dextranlösung notwendig. Variable Größen wie Hämatokrit, pH, Sauerstoffsättigung, Fibrinogen, MCV, MCHC und Osmolarität wurden bezüglich des Einflusses auf die Filtrationsmethode untersucht, diskutiert und standardisiert. Der ermittelte Normalbereich der relativen Flußrate ist 0,555 ± 0,114 ($\bar{x}$ ± 2 SD) bei einem Hämatokrit von 10 %, pH von 7,39, Druckgradienten von 5 cm H_2O, Temperatur von 37,0 C, Sauerstoffsättigung von 100 %, Fibrinogenspiegel im Normbereich und Plasma von normaler Osmolarität.

Zur Bestimmung der Beeinflussung der Verformbarkeit von Erythrozyten durch den Gallefarbstoff wurden minimalste Mengen einer NaOH-Bilirubinlösung den Erythrozytensuspensionen zugegeben, ohne daß sich der pH-Wert veränderte. Die mittlere Bilirubinkonzentration lag bei 4,4 mg ± 0,5 mg %. Die Filtrationsraten nach 30, 60, 120 und 180 Minuten Inkubation wurden bestimmt. Das Gleiche wurde mit einem nur NaOH-enthaltenden Leerwert durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten einen signifikanten bilirubinabhängigen schnelleren Abfall der Verformbarkeit gegenüber einem Leerwert nach 60, 120 und 180 Minuten. Das Waschen der bilirubininkubierten Erythrozyten nach 3 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung und das Resuspendieren in normales Eigenplasma führt zu einem Wiederanstieg der Verformbarkeit auf normale Werte.

Welche Mechanismen zu dem reversiblen bilirubininduzierten Abfall der Verformbarkeit führen, bleibt letztlich unklar. Membranveränderungen werden diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Allen, J.E.,Valeri, C.R.: Prostaglandins in Hematology.
   Arch.Intern.Med. 133, 86 - 96 (1974)

2. Baar, S.: A convenient and reproducible filtration technique for the determination of erythrocyte flexibility.
   Br. J. Haematol. 34: 69-78 (1976)

3. Baar, S.: The influence of catecholamines and prostaglandins on calcium efflux and filtrability of thermally damaged erythrocytes: An in vitro study.
   Br. J. exp. Path. 63: 644-650 (1982)

4. Ballas, S.K., Saidi, P., Constantino, M.: Reduced erythrocytic deformability in megaloblastic anemia.
   Am. J. Clin. Pathol. 66: 953-957 (1976)

5. Barbenel, J.C.: The measurement of red blood cell deformability.
   aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity an cell deformability. Springer 1981

6. Barnes, A.J.: Blood viscosity in diabetes mellitus.
   aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity an cell deformability. Springer 1981.

7. Barnhart, J.L., Clarenburg, R.: Binding of bilirubin to erythrocytes.
   Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 1101-1103 (1973)

8. Behrman, R.E., Hsia, D.Y.Y.: Summary of a symposium on phototherapy for hyperbilirubinemia.
J. Pediatr. 75: 718- 726 (1969)

9. Bergentz, S.E., Danon, D.: Alterations in red blood cells of traumatized rabbits. 1. Decreased filterability.
Acta Chir. Scand. 130: 165-172 (1965)

10. Bergqvist, G., Bygdeman, S., Rylander, E.: Deformability of fetal erythrocytes.
Bibl. anat. 16: 510-512 (Karger, Basel 1977)

11. Bessis, M., Mohandas, N., Feo, C.: Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices.
Blood Cells 6: 315-327 (1980)

12. Betke, K.: Hämatologie der ersten Lebenszeit.
Erg. inn. Med. Kinderheilk. N. F. 9: 437-509 (1958)

13. Blackburn, M.G., Orzalesi, M.M., Pigram, P.: Effect of light and bilirubin on fetal red blood cells in vitro.
Biol. Neonate 21: 35-43 (1972)

14. Bratlid, D.: Bilirubin binding by human erythrocytes.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29: 91-97 (1972)

15. Bratlid, D., Fog, J.: The binding capacity of human albumin for bilirubin and its significance in the pathogenesis of kernikterus.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 25: 257-261 (1970)

16. Brown, A.K.: Bilirubin metabolism with special reference to neonatal jaundice.
Advanc. Paediat. 12: 121-187 (1962)

17. Buchan, P.C., Macdonald, H.N.: Rheological studies in obstretics an gynaecology.
aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability, Springer 1981.

18. Buchan, P.C.: Evaluation and modification of whole blood filtration in the measurement of erythrocyte deformability in pregnancy and the newborn.
Brit. J. Hematol. 45: 97-105 (1980)

19. Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie.
W. d. Gruyter, Berlin, New York 1973, 3. Auflage

20. Bull, B.S., Brailford, J.D.: Red cell membrane deformability: New data.
Blood 48: 663-667 (1976)

21. Bunn, F.: Erythrocyte destruction and hemoglobin catabolism.
Semin. Hematol. 9: 3-17 (1972)

22. Burton, A.C.: Physiologie und Biophysik des Kreislaufs.
V. Viskosität und Blutströmung S. 56-67.
Schattauer Verlag 1969

23. Burton, A.C.: Role of geometry, of size and shape in the microcirculation.
Fed. Proc. 25: 1753-1760 (1966)

24. Canham, P.B.: Difference in geometry of young and old human erythrocytes explained by a filtering mechanism.
Circ. Res. 25: 39-45 (1969)

25. Cheung, W.H., Sawitzky, A., Isenberg, H.D.: The effect of bilirubin on the mammalian erythrocyte.
Transfusion 6: 475-486 (1966)

26. Chien, S., Usami, S., Dellenback, R.J., Bryant, C.A., Gregersen, M.I.: Change of erythrocyte deformability during fixation in acetaldehyde.
Internat. Soc. Hemorheology, Second international Conference, Heidelberg, Germany 1969, pp. 136-143

27. Chien, S., Luse, S.A., Bryant, C.A.: Hemolysis during filtration through micropores: A scanning electron microscopic and hemorheologic correlation.
Microvasc. Res. 3: 183-203 (1970)

28. Chien,S.: Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability.
Blood Cells 3: 71-99 (1977)

29. Clauss, A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens.
Acta haemat. 17: 237-246 (1957)

30. Cooper, R.A.: Influence of membrane lipid alterations on red cell function.
aus: Jamieson, G.A., Greenwalt, T.J.: Red-Cell-Membrane, Structure and function, S. 339-351
J.B. Lippincott Comp. 1969

31. Day, R.L.: Inhibition of brain respirations in vitro by bilirubin. Reversal inhibition by various means.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 85: 261 (1954)

32. DeCree, J., DeCock, W., Geukens, H., DeClerck, F., Beerens, M., Verhaegen, H.: The rheological effects of cinnarizine and flunarizinne in normal and pathologic.
Angiology 30: 505-515 (1979)

33. Deziel, M.R., Girotti, A.W.: Photodynamic action of bilirubin on liposomes and erythrocyte membranes.
J. Biol. Chem. 255: 8192-8198 (1980)

34. Dintenfass, L.: Hemorheological factors in Raynaud's phenomen.
Angiology 28: 472-481 (1977)

35. Dintenfass, L. Lake, B.: Beta-blockers and blood viscosity.
Lancet 1976: 1026

36. Di Perri, T., Forconi, S., Guerrini, M., Pasini, F.L., Del Cippola, R., Rossi, C., Angnusdei, D.: Action of cinnarizine on the hyperviscosity of blood in patients with peripheral obliterative arterial disease.
Angiology 30: 13-20 (1979)

37. Dodds, A.J., O'Reilly, M.J.G., Yates, C.J.P., Cotton, L.T., Flute, P.T., Dormandy, J.A.: Haemorheological response to plasma exchange in Raynaud's syndrome.
Brit. Med. J. 1979, 2: 1186-1187 (1979)

38. Dormandy, J.A., Ernst, E.: Effects of buflomedil on erythrocyte deformability.
Angiology 32: 714-716 (1981)

39. Dormandy, J.A.: Drug modification of erythrocyte deformability.
aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability, Springer 1981

40. Eaton, J.W., Jacob, H.S., White, J.G.: Membrane abnormalities of irreversibly sickled ells.
Semin. Hemat. 16: 52-64 (1979)

41. Ehrly, A.M., Roßbach, P.: The detection of changes in erythrocyte sh pe by a filtration method using 8 µm filters.
in: Gerlach, Moser, Deutsch, Wilmans (Hrsg.): Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes, pp. 52-53, Thieme 1973

42. Ehrly, A.M.: Beeinflussung der Verformbarkeit der Erythrozyten durch Pentoxifyllin.
in: Breddin, Gross, Rotter(Hrsg.): 10. Angiologisches Symposium Kitzbühel, Exogene Faktoren bei arteriellen Gefäßerkrankungen und venösen Thrombosen, S. 174-178,
Schattauer 1976

43. Ehrly, A.M., Köhler, H.J.: Altered deformability of erythrocytes from patients with chronic occlusive arterial disease.
Vasa 5: 319-322 (1976)

44. Ehrly, A.M., Landgraf, H.: Einfluß von Vincamin auf die Fließeigenschaften des Blutes.
Fortschr. Med. 100: 969-971 (1982)

45. Ernst, E.: Methoden zur Bestimmung der Erythrozytenflexibilität.
Med. Lab. (Stuttg.) 34: 155-158 (1981)

46. Ernst, E.: Klinische Manifestation reduzierter Erythrozytenflexibilität.
MMW 125: 74-78 (1983) Nr.15

47. Ernst, E.: Pharmakologische Beeinflussung reduzierter Erythrozytenflexibilität.
MMW 125: 74-78 (1983) Nr.23

48. Ernst, E.: Phamakologische Beeinflussung reduzierter Erythrozytenflexibilität.
MMW 125: 74-76 (1983) Nr.24

49. Ernst, E., Marshall, M.: Verbesserung der reduzierten Erythrozytenflexibilität durch Calciumdobesilat.
MMW 126: 125-126 (1984)

50. Gioia, I.A., Serrani, R.F., Corchs, I.L.: Bilirubin adsorption in vitro by foetal and adult human erythrocytes.
J. Clin.Chem.Clin.Biochem. 19: 371-374 (1981)

51. Girotti, A.W.: Photodynamic action of bilirubin on human erythrocyte membranes. Modification of polypeptide constituents.
Biochemistry 14: 3377-3383 (1975)

52. Glushko, V., Thaler, M., Ros, M.: The fluorescence of bilirubin upon interaction with human erythrocyte ghosts.
Biochim. Biophys. Acta 719: 65-73 (1982)

53. Gregersen, M.I., Bryant, C.A., Hammerle, W.E., Usami, S., Chien,S.: Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves.
Science 157: 825-827 (1967)

54. Gross, G.B., Hathaway, W.E.: Fetal erythrocyte deformability.
Pediatr. Res. 6: 593-599 (1972)

55. Halbhuber, K.J., Unger, J., Geyer, G.: Intravitale Lebenszeit und Verformbarkeit schwach amidinierter Rattenerythrozyten.
Folia Haematol. (Leipzig) 103: 534-540 (1976)

56. Hanss, M.: Erythrocyte filtrability measurement by the initial flow rate method.
Biorheology 20: 199-211 (1983)

57. Heilmann, L., Kurz, E.: Die Beschreibung einer einfachen Filtrationstechnik zur Erfassung der Erythrozytenverformbarkeit in der Schwangerschaft.
Blut 35: 213-221 (1977)

58. Heilmann, L., Schmid-Schönbein, H.: Ein methodischer Beitrag zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit.
Klin. Wochenschr. 59: 181-185 (1981)

59. Imre, S.: A modified method for measuring the filtrability of erythrocytes.
Blut 34: 49-52 (1977)

60. Irwin, S.T., Rocks, M.J., Mc Guigan, J.A., Patterson, C.C., Morris, T.C.M., O'Reilly, M.J.G.: Effect of reconstructive vascular surgery on red cell deformability - preliminary results.
J. Clin. Pathol. 36: 1136-1139 (1983)

61. Jacobsen, J., Brodersen, R.: Albumin-bilirubin binding mechanism.
J.Biol.Chem. 258: 6319-6326 (1983)

62. Jandl, J.H., Simmons, R.L., Castle, W.B.: Red cell filtration and the pathogenesis of certain hemolytic anemias.
Blood 18: 133-148 (1961)

63. Jendrassik, L., Grof, P.: Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins.
Eur. J. Biochem. 297: 81-89 (1938)

64. Johnsson, R., Frick, M.H., Valle, M., Vuopio, P., Tarssanen, L.: Red cell flexibility and oxygen affinity in patients with angina pectoris and normal coronary arteries.
Ann. Clin. Res. 13: 77-80 (1981)

65. Kaufmann, N.A., Simcha, A.J., Blondheim, S.H.: The uptake of bilirubin by blood cells from plasma and its relationship to the criteria for exchange transfusion.
Clin. Science 33: 201-208 (1967)

66. Kirschner-Zilber, I., Rabizadek, E., Shaklai, N.: The interaction of hemin and bilirubin with the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 690: 20-30 (1982)

67. Koul, B.L., Nordhas, O., Sonnenfeld, T., Ekeström, S.: The effect of penoxifylline on impaired red cell deformability following open-heart surgery.
Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 18: 129-131 (1984)

68. Kovacs, I.B., O'Grady, J.: Prostacyclin increases filterability of normal and rigidified human red blood cells in vitro.
Agents and Actions 14: 306-310 (1984)

69. Krieg, W.: Glucoseverbrauch und energiereiche Phosphate von Erythrozyten bei Inkubation mit Bilirubin.
Dissertation, Düsseldorf med Fak., 1976

70. Labbe, R.F., Zaske, M.R., Aldrich R.A.: Bilirubin inhibition of heme biosynthesis.
Science 129: 1741-1742 (1959)

71. LaCelle, P.L., Arkin, B.: Aquired rigidity: a possible determinant of normal RBC life span.
Blood 36: 837 (1970)

72. LaCelle, P.L.: Alteration of membrane deformability in hemolytic anemias.
Semin. Hematol. 7: 355-371 (1970)

73. LaCelle, P.L., Kirkpatrick, F.H., Udkow, M.: Relation of altered deformability ATP, DPG and Ca concentrations in senescent erythrocytes.
in: Gerlach, Moser, Deutsch, Wilmans (Hrsg.): Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes, pp. 49-52
Thieme 1973

74. Leblond, P.F., Coulombe, L.: The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes
J. Lab. Clin. Med. 94: 133-143 (1979)

75. Leonhardt, H., Reinhardt, I.: Methodische Untersuchung zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit (Filtrabilität, Flexibilität, Fluidität) in Abhängigkeit der Plasmaviskosität, der Plasmaproteine, des Hämatokrits, des Filtrationsdruckes sowie der Osmolarität.
Experientia 33: 179-181 (1977)

76. Lessin, L.S., Kurantsin-Mills, J., Weems, H.B.: Deformability of normal and sickle erythrocytes in a pressure-flow filtration system.
Blood Cells 3: 241-262 (1977)

77. Linderkamp, O., Wu, P.Y.K., Meiselman, H.J.: Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults.
Pediatr. Res. 16: 964-968 (1982)

78. Lux, S.E.: Dissecting the red cell membrane skeleton.
Nature 281: 426-429 (1979)

79. Marcel, G.A.: Red cell deformability: Physiological, clinical and pharmacological aspects.
J. Med. 10: 409-416 (1979)

80. Matthews, P.N.: Surgery and post-operative thrombosis.
aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability, Springer 1981

81. McMillan, D.E., Utterback, N.G., LaPuna, J.: Reduced erythrocyte deformability in diabetes.
Diabetes 27: 895-901 (1978)

82. Mercke, C., Lundh, B.: Erythrocyte filtrability and heme catabolism during menstrual cycle. Ann. Intern. Med. 85: 322-324 (1976)

83. Mohandas, N., Chasis, J.A., Shohet, S.B.: The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material prperties and shape. Semin. Hematol. 20: 225-242 (1983)

84. Mohandas, N., Phillips, W.M., Bessis, M.: Red blood cell deformability and hemolytic anemias. Semin. Hematol. 16, 95-114 (1979)

85. Murphy, J.R.: The influence of pH and temperature on some physical properties of normal erythrocytes and erythrocytes from patients with hereditary spherocytosis. J. Lab. Clin. Med. 69: 758-775 (1967)

86. Norton, J.M., Rand, P.W.: Decreased deformability of erythrocytes from smokers. Blood 57: 671-674 (1981)

87. Odell, G.B., Brown, R.S., Kopelman, A.E.: The photodynamic action of bilirubin on erythrocytes. J. Pediatrics 81: 473-483 (1972)

88. Odell, G.B.: The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. J. Pediatr. 55: 268 (1959)

89. Oski, F.A., Naiman, J.L.: Red cell binding of bilirubin. J. Pediatr. 63: 1034 (1963)

90. Oski, F.A., Lubin, B., Buchert, E.D.: Reduced red cell filterability with oral contraceptive agents. Ann. Int. Med. 77: 417-419 (1972)

91. Palek, J., Lin, A., Liu, D., Snyder, L.M., Fortier, N.L., Njoku, G., Kiernan, F., Funk, D., Crusberg, T.: Effect of procaine HCl on ATP: Calcium dependent alteration in red cell shape and deformability. Blood 50: 155-164 (1977)

92. Paulsen, E.P., Koury, M.: Hemoglobin A-1-C levels in insulin-dependent and -independent diabetes mellitus. Diabetes 25 (Suppl. 2): 890-896 (1976)

93. Petrich, C.: Bilirubin und Erythrozytenstoffwechsel des Neugeborenen. Habilitationsschrift Düsseldorf Kinderklinik II 1976

94. Petrich, C., Krieg, W., v.Voss, H., Göbel, U.: Effects of bilirubin on red cell metabolism. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15: 77-80 (1977)

95. Petrich, C., Göbel, U.: On the regulation of 2,3-Diphosphoglycerate concentration in the erythrocytes of newborns with transitory hyperbilirubinämia. Z. Kinderheilk. 117: 121-126 (1974)

96. Petrich, C., Göbel, U., Delvos, U.: Effect of bilirubin on stored red blood cells. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13: 461-464 (1975)

97. Powell, L.W., Dunnicliff, M.A., Billing, H.B.: Red Cell survival in experimental cholestatic jaundice. Br. J. Hematol. 15: 429-435 (1968)

98. Powell, L.W.: Haemolysis and bilirubin production in obstructive jaundice. in: Bouchier, I.A.D., Billing, B.H.: Bilirubin metabolism, p. 65, Blackwell Scientific Publ. Oxford 1967

99. Rakow, A.L., Hochmuth, R.M.: Thermal transition in the human erythrocyte membrane: Effect on elasticity. Biorheology 12: 1-3 (1975)

100. Rand, P.W., Lacombe, E., Barker, N.D., Kallechey, G.L.: Effects of methylprednisolone on the physical properties of the human red cell.
J. Lab. Clin. Med. 89: 1241-1250 (1977)

101. Rapaport, S.M.: Medizinische Biochemie, 5. Aufl. S. 618/9, Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1969

102. Reid, H.L., Barnes, A.J., Lock, P.J., Dormandy, J.A., Dormandy, T.L.: A simple method for measuring erythrocyte deformability.
J. Clin. Pathol. 29: 855-858 (1976)

103. Reid, H.L., Dormandy, J.A., Barnes, A.J., Lock, P., Dormandy, T.L.: Red cell defomability.
Lancet May 15, 1976 (Briefwechsel)

104. Reid, H.L., Dormandy, J.A., Barnes, A.J., Lock, P.: Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease.
Lancet 1976: 666-668

105. Rola-Pleszczynski, M., Hensen, S.A., Vincent, M.M., Bellanti J.A.: Inhibitory effects of bilirubin on cellular immune responses in man.
J. Paediatr. 86: 690-696 (1975)

106. Rusch, P., Herrmann, T., Gryssant, A., Vasselon, C., Champailler, A., Healy, J.C.: Influence of oxygen tensions, intracellular enzymes and hematological factors on red blood cell filterability.
Biorheology 18: 493-499 (1981)

107. Sachs, L.: Statistische Methoden, 2. Aufl.
Springer Verlag 1970

108. Sacks, A.H., Bradley, M., North, P.: Filtration measurements to determine the effects of red cell rigidity and aggregation on resistance to flow.
Microvasc. Res. 22: 331-344 (1981)

109. Sato, H., Kashiwamata, S.: Interaction of bilirubin with human erythrocyte membranes.
Biochem. J. 210: 489-496 (1983)

110. Schmid-Schönbein, H., Ernst, E.: Klinische Relevanz der Erythrozytenflexibilität.
MMW 123: 104-106 (1981)

111. Schmid-Scönbein, H., Weiß, J., Brandhuber, M.:
Der Einfluß von Bencyclan auf das Fließverhalten von Erythrozyten und Vollblut.
Herz/Kreisl. 7: 475-480 (1975)

112. Schmid-Schönbein, H., Wells, R.: Red cell aggregation and red cell deformation: Their influence on blood rheology in health and disease.
Internat. Soc. Hemorheology, Second International Conference, Heidelberg, Germany, 1969, pp. 348-355

113. Schmid-Schönbein, H. Wells, R.E.: Rheological properties of human erythrocytes and their influence upn the "anomalous" viscosity of blood.
Ergebnisse der Physiologie 63:146-219 (1971)

114. Schmid-Schönbein, H., Wells, R.E., Goldstone J.:
Fluid-drop-like behaviour of erythrocytes - Disturbance in pathology and its quantification.
Biorheology 7: 227-234 (1971)

115. Schmid-Schönbein, H. Weiss, J., Ludwig, H.: A simple method for measuring red cell deformability in models of the microcirculation. Blut 26: 369-379 (1973)

116. Schmid-Schönbein, H.: Einführung in die Hämorheologie: Fließeigenschaften, Fließbedingungen und Methodik. Phlebol. Proctol. 2: 205-226 (1973)

117. Schmid-Schönbein, H., Volger, E., Klose, Weiss, J.: Blood microrheology and the development of "stasis" in the microvasculature after injury. in: Kovack, Stoner, Spitzer: Neurohumoral and metabolic aspects of injury, pp. 65-73, Eds. Plenum Public., New York 1973

118. Schmid-Schönbein, H., Volger, E. : Red cell aggregation and red cell deformability in diabetes. Diabetes 25 (Suppl. 2): 897-902 (1976)

119. Seyfried, H. Klicpera, M., Leithner, C., Penner, E. : Bilirubinstoffwechsel. Wien. klin. Wochenschr. 88: 477-482 (1976)

120. Sheetz, M.P.: Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. Semin. Hematol. 20: 175-188 (1983)

121. Shohet, S.B.: Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids. New Engl. J. Med. 286: 638-644 (1972)

122. Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie Thieme 1973

123. Singelmann, E., Steffen, C.: Increased erythrocyte rigidity in chlorate poisoning. J. Clin. Path. 36: 719 (1983)

124. Sirs, J.A.: Automatic recording of the rate of packing of erythrocytes in blood by a centrifuge.
Phys. Med. Biol. 15: 9-14 (1970)

125. Sirs, J.A., Rampling, M.W.: Red cell deformability.
Lancet 1976: 905 (Briefwechsel)

126. Sowemimo-Coker, S.O., Kovacs, I.B., Pickles, H., Hedges, A., Turner, P.: Dipyridamole increases red cell deformability.
Br. J. clin. Pharmac. 16: 423-425 (1983)

127. Stäubli, M., Straub, P.W.: Red cell filtration by paper filters.
Blut 39: 333-344 (1979)

128. Stuart, J., Kenny, M.W., Inglis, T.C.M.: Erythrocyte filterability in normal pregnancy and pre-eclampsia.
Br. J. Haematol. 53: 353-355 (1983)

129. Tannert, C., Schmidt, G., Steinhoff, A., Staack, R.: Untersuchungen zur Verformbarkeit roter Blutzellen bei Lagerung mit einem einfachen Filtrationsverfahren.
Acta biol. med. germ. 38:1595- 1600 (1979)

130. Taverna, R.D., Langdon, R.G.: D-Glucosylisothiocyanate, an affinity label for glucose transport proteins of the human erythrocyte membrane.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 593-599 (1973)

131. Teitel, P.: Basic principles of the "Filterability test" (FT) and analysis of erythrocyte flow behaviour.
Blood cells 3: 55-70 (1977)

132. Teitel, P.: Le test de la filtrabilite erythrocytaire (TFE). Une methode simple d'etude de certaines proprietes microrheologiques des globules rouges.
Nouv. Rev. Fr. Hematol. 7: 195-214 (1967)

133. Tillmann, W., Labitzke, N., Schröter, W.:
Rheological properties of red cells in Haemoglobin Köln disease.
Br. J. Haemat. 33: 279-287 (1976)

134. Tillmann, W., Schröter, W.:
Der Einfluß von Heinzkörpern auf die rheologischen Eigenschaften von Patienten mit Heinzkörperanämie (Hämoglobin Köln).
Mschr. Kinderheilkunde 124: 312-314 (1976)

135. Tillmann, W., Wagner, D., Schröter, W.: Verminderte Flexibilität der Erythrozyten von Neugeborenen.
Blut 34: 281-288 (1977)

136. Volger, E., Schmid-Schönbein, H. Emmerich, B.: Red cell aggragation and deformability in plasma cell dyscrasis.
9. Europ. Conf. Microcirculation, Antwerpen 1976
Bibl. anat. 16: 513-516

137. Walker, C.H.M.: Blood rheology in the newborn.
aus: Lowe, G.D.O., Barbenel, J.C., Forbes, C.D.: Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability, Springer 1981

138. Waller, D.G., Nicholson, H.P., Roath, S.: The acute effects of nifedipine on red cell deformability in angina pectoris.
Br. J. clin. Pharmac. 17: 133-138 (1984)

139. Watson, D.: The absorption of bilirubin by erythrocytes.
Clin. Chim. Acta 7: 733-734 (1962)

140. Weed, R.I., LaCelle, P.L., Merrill, E.W.: Metabolic dependence of red cell deformability.
J. clin. Invest. 48: 795-809 (1969)

141. Weed, R.I., LaCelle, P.L.: ATP-dependance of erythrocyte membrane deformability.
in: Jamieson, Greenwaldt: Red-cell-membrane, Structure and function, pp. 319-338, J.B. Lippincott Comp 1969

142. Weed, R.I.: The importance of erythrocyte deformability.
Amer. J. Med. 49: 147-150 (1970)

143. Weed, R.I., LaCelle, P.L., Udkow, M.: Structure and function of the red cell membrane: Changes during storage.
in: Greenwalt, Jamieson: The human red cell in vitro, pp. 65-82, Grune and Stratton, New York 1974

144. Weiss, L., Tavassoli, M.: Anatomical hazards to the passage of erythrocytes through the spleen.
Semin. Hematol. 7: 372-380 (1970)

145. Werner, U.: Messungen der Erythrozytenverformbarkeit unter Pentoxifyllin und niedermolekularen Dextran.
in: Breddin, Gross, Rotter: 10. Angiologisches Symposion Kitzbühel, Exogene Faktoren bei arteriellen Gefäßerkrankungen und venösen Thrombosen, S. 179-182, Schattauer 1976

146. Williamsen, J.R., Shanahan, M.O., Hochmuth, R.M.: The influence of temperature on red cell deformability.
Blood 46:611-624 (1975)

147. Yamaguchi, H., Alls, M., Roberts, D.: The effect of urea on red cell deformability during cardiopulmonary bypass.
Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 18: 119-122 (1984)

148. Zetterström, R., Ernster, L.: Bilirubin, an uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria.
Nature 178: 1335-1337 (1956)

149. Zingg, w., Sulev, J.C., Morgan, C.D., Ehrlich, R.M.: Blood viscosity in diabetic children.
Diabetologia 7: 461-462 (1971)

Herrn Prof. Dr. U. Göbel danke ich für die Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Steinhagen, dessen Hilfsbereitschaft und Unterstützung wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung (Abstract)

Peter Trotzke: Die Verformbarkeit von Erythrozyten nach Inkubation mit Bilirubin.

Toxische Wirkungen des Bilirubins auf Erythrozyten sind hinlänglich bekannt (Abfall von energiereichen Phosphaten, Hemmung des Glucoseverbrauches, Membranveränderungen, Hämolyse).
Thema der vorliegenden Arbeit ist der Einfluß von Bilirubin auf die Verformbarkeit von Erythrozyten.
Im ersten Teil der Arbeit wird die Entwicklung einer Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit geschildert. Als Maß der Flexibilität wird eine relative Flußrate angenommen, die aus dem Quotienten der Flußraten von Erythrozytensuspensionen und zellfreiem Plasma errechnet wird. Der ermittelte Normalbereich der relativen Flußrate ist 0,555 ± 0,114 (x ± 2SD) bei Filtern mit einem mittleren Porendurchmesser von 4,5 µm, bei einem Hämatokrit von 10 %, pH von 7,39, Druckgradienten von 5 cm H_2O, Temperatur von 37,0 C, Sauerstoffsättigung von 100 %, normalem Fibrinogenspiegel und normaler Plasmaosmolarität.
Nach Zugabe von Bilirubin (mittlere Bilirubinkonzentration 4,4 ± 0,5 mg %) werden die Filtrationsraten nach 30, 60, 120 und 180 Minuten Inkubation im Vergleich zu einem Leerwert bestimmt. Die Untersuchungen zeigen einen signifikanten bilirubinabhängigen schnelleren Abfall der Verformbarkeit gegenüber einem Leerwert nach 60, 120 und 180 Minuten. Das Waschen der bilirubininkubierten Erythrozyten nach 3 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung und das Resuspendieren in normales Eigenplasma führt zu einem Wiederanstieg der Verformbarkeit auf normale Werte.
Welche Mechanismen zu dem reversiblen bilirubininduzierten Abfall der Verformbarkeit führen, bleibt letztlich unklar. Membranveränderungen werden diskutiert.

Referent: Prof. Dr. U. Göbel